

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
&
UNIVERSITÉ JEAN MONNET
FACULTÉ DE MÉDECINE JACQUES LISFRANC

ALAN GRUPIONI LOURENÇO

Estudo in vitro da capacidade da lactoferrina e de seu produto de clivagem (G-12-I), presentes nas secreções orais e genitais, de modular a produção de CCL20 pelas células do epitélio endocervical: Envolvimento com a transmissão sexual do HIV.

Ribeirão Preto

2011

Alan Grupioni Lourenço

Estudo in vitro da capacidade da lactoferrina e de seu produto de clivagem (G-12-I), presentes nas secreções orais e genitais, de modular a produção de CCL20 pelas células do epitélio endocervical: Envolvimento com a transmissão sexual do HIV.

Tese em co-tutela apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e a Faculté de Médecine Jacques Lisfranc, Université Jean Monnet para a obtenção do grau de doutor.

Orientadores: Profa. Dra. Alcyone Artioli Machado

Prof. Dr. Bruno Pozzetto

Ribeirão Preto

2011

**AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA À FONTE.**

FICHA CATALOGRÁFICA

Lourenço, Alan Grupioni

Estudo in vitro da capacidade da lactoferrina e de seu produto de clivagem (G-12-I), presentes nas secreções orais e genitais, de modular a produção de CCL20 pelas células do epitélio endocervical: Envolvimento com a transmissão sexual do HIV. 157 f. : il. ; 30cm.

Tese em co-tutela apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e a Faculté de Médecine Jacques Lisfranc, Université Jean Monnet para a obtenção do grau de doutor.

Orientador: Machado, Alcyone Artioli; Pozzetto, Bruno

1. Aids; 2. HIV; 3. Transmissão sexual; 4. Lactoferrina; 5. G-12-I; 6. CCL20; 7. Plasma seminal; 8. Saliva; 9. Conteúdo vaginal, 10. Células epiteliais endocervicais.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Alan Grupioni Lourenço

Estudo in vitro da capacidade da lactoferrina e de seu produto de clivagem (G-12-I), presentes nas secreções orais e genitais, de modular a produção de CCL20 pelas células do epitélio endocervical: Envolvimento com a transmissão sexual do HIV.

Tese em co-tutela apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e a Faculté de Médecine Jacques Lisfranc, Université Jean Monnet para a obtenção do grau de doutor.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

Dedicatória

Família é sinônimo de amor. Sempre me espelhei em meus familiares, sempre quis ser como eles. Levanto a cada manhã, pensando em quantas vezes meu pai Antônio e minha mãe Maria de Lourdes acordaram apressados e o quanto se privaram para que eu pudesse estar aqui defendendo essa tese de doutorado.

Mas a vida, para mim, sempre reserva algo mais...

Pessoas do meu dia-a-dia foram completando os ensinamentos que herdei de minha família. Pessoas pelas quais nutro profunda admiração:

Prof^a. Marilena, exemplo de docente e ser humano. Está sempre disposta a ajudar. Ela sempre foi o elo de todas as oportunidades que me foram ofertadas.

Prof^a. Alcyone, para mim, exemplo de dedicação e ética profissional. Quantas vezes suas palavras me deram confiança para continuar. Lições que se levam para toda a vida.

Prof. Bruno, com o senhor aprendi a conciliar trabalho e família. Homem bondoso e dedicado, exemplo para todos que estão a sua volta.

Juliana, minha companheira, aquela que me alegra diariamente seja com palavras ou com seus gestos sempre nobres. Estivemos sempre juntos mesmo quando me fiz distante, sempre criamos nosso cotidiano com muito amor e dedicação.

À minha família e as pessoas que se juntaram a ela. A vocês dedico esse trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, pela oportunidade de me aperfeiçoar como ser humano, seja em dias de conquistas ou perdas.

Às minhas irmãs Jéssica e Luana, que completam meus dias de felicidade. Meninas cheias de garra!

À minha afilhada Stephany, que com sua tenra idade, enche meus dias de esperança.

Ao meu avô Adelino e avó Valdomira, suas palavras vagarosas e repletas de carinho faz qualquer neto especial.

À minha avó Ana e avô Chico (in memorian). Espero que esse doutorado tenha deixado-os felizes. Espero que tenha se cumprido seus dizeres.

À dona Luzia e seu Samuel, Aline e Lucas pela confiança em mim depositada. Desde já parte de minha família.

Aos meus tios. Nada melhor do que um domingo ao lado de vocês para recompor as energias para a próxima semana.

Ao Olivier Délézay, devo a você meus aprendizados do ano que fiquei em Saint-Etienne. Perfeccionista e cuidadoso.

Aos meus amigos do GIMAP, Saint-Etienne. Passei no laboratório francês um ano inesquecível, não apenas pelo o que aprendi, mas também pela gentileza das pessoas que convivi.

Aos familiares do Prof. Bruno Pozzetto, pelo acolhimento em sua terra, e pelos prazerosos domingos.

Aos meus amigos, aqueles a que sempre recorro para um desabafo ou para um bom papo-furado de final de semana.

À Ana Carolina Fragoso Motta, Cristiano Nakao e aos demais amigos do DAPE, lugar onde dividimos sonhos semelhantes.

Aos amigos do laboratório Dona Edna e Cléber, e em especial ao Gilberto, pelos socorros prestados e pelo precioso auxílio.

À Prof^a. Silvana Quintana, pelo auxílio e disponibilidade durante as coletas das amostras biológicas.

À Prof^a. Maria José Alves da Rocha por disponibilizar seus equipamentos e pela disponibilidade.

Aos secretários da Clínica Médica, Émerson e Adriana, pela paciência e orientação.

Para a realização desse estudo, contei com a colaboração de mais de cem pessoas que se dispuseram a participar desse trabalho. Geralmente, eles estavam no Hospital das Clínicas resolvendo seus problemas de saúde, ou acompanhando alguém que amavam.

Mesmo nesse momento delicado, esses homens e mulheres se propuseram a participar de uma pesquisa de um aluno de doutorado que não conheciam. A vocês obrigado pela confiança e disponibilidade.

RESUMO

Lourenço A.G. **Estudo in vitro da capacidade da lactoferrina e de seu produto de clivagem (G-12-I), presentes nas secreções orais e genitais, de modular a produção de CCL20 pelas células do epitélio endocervical: Envolvimento com a transmissão sexual do HIV.** 2011. 157f. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

As células dendríticas, dentre elas as células de Langerhans, são capazes de apresentar o vírus da imunodeficiência humana (HIV) aos linfócitos T CD4+, cujo processo culmina com a infecção por esse vírus. O recrutamento das células de Langerhans na mucosa vaginal é modulada pela *Quimiocin C-C motif ligant 20* (CCL20), produzida pelas células epiteliais da mucosa genital feminina. O objetivo desse trabalho foi estudar a capacidade do plasma seminal, da saliva e do conteúdo vaginal de induzir a produção de CCL20 pela cultura de células do epitélio monoestratificado endocervical (HEC-1A), relacionando tal produção com a presença da lactoferrina (Lf) e de seu produto de clivagem (G-12-I) nestes fluidos. Culturas de células HEC-1A foram estimuladas com plasmas seminais, salivas e conteúdos vaginais de participantes soronegativos e soropositivos para o HIV, visando avaliar a produção de CCL20, a qual foi mensurada utilizando-se o *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). A dosagem de Lf (ELISA) foi realizada em todas as amostras estudadas e a presença do peptídeo de clivagem da Lf (G-12-I) observada nas amostras que mais e que menos induziram a secreção de CCL20 pelas células HEC-1A por Western blot. Verificou-se que os plasmas seminais de participantes soropositivos foram responsáveis por maior estimulação da produção de CCL20 pelas células HEC-1A, quando comparados aos plasmas seminais de participantes soronegativos para o HIV. A concentração de Lf no plasma seminal associou-se à indução na produção de CCL20 pelas células HEC-1A, assim como as amostras que mais induziram a produção de CCL20 apresentaram presenças mais evidentes do peptídeo de clivagem da Lf (G-12-I). A saliva foi responsável pela estimulação na produção de CCL20 pelas células HEC-1A, no entanto, tal estimulação não se associou à concentração de Lf salivar. Concluímos que a presença de Lf no plasma seminal esteve correlacionada à produção de CCL20 pelas células HEC-1A, e que a saliva pode induzir a produção da CCL20 pelas células epiteliais endocervicais.

Palavras chaves: 1. Aids; 2. HIV; 3. Transmissão sexual; 4. Lactoferrina; 5. G-12-I; 6. CCL20; 7. Plasma seminal; 8. Saliva; 9. Conteúdo vaginal, 10. Células epiteliais endocervicais

RÉSUMÉ

Lourenço A.G. **Étude in vitro de la capacité de la lactoferrine et son produit de clivage (G-12-I), présent dans les sécrétions orales et génitales, de moduler la production de CCL20 par les cellules épithéliales endocervicales: Implication dans la transmission sexuelle du VIH.** 2011. 157f. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Les cellules dendritiques présentes dans les muqueuses comme les cellules de Langerhans, sont capables de présenter le Virus d'Immunodéficience Humaine (VIH) aux lymphocytes T CD4+, aboutissant à l'infection par le VIH lors de contacts hétérosexuels non protégés. Le recrutement des cellules de Langerhans dans la muqueuse vaginale est assuré par la chimiokine *Quimiocin C-C motif ligand 20* (CCL20) produite par les cellules épithéliales de la muqueuse. L'objectif de ce travail a été d'étudier la capacité du plasma séminal, de la salive et de la sécrétion vaginale à stimuler la production de CCL20 par les cellules de l'épithélium endocervical (cellules HEC-1A), et de corréler cette production avec la présence de la lactoferrine (LF) et de ses produits de clivage dans ces différents fluides biologiques. Des cellules HEC-1A ont été cultivées avec les plasmas séminaux, les salives et les sécrétions vaginales de patients séronégatifs et séropositifs pour le VIH, et la production de CCL20 a été mesurée dans les surnageants cellulaires en ELISA. Le dosage de la Lf par ELISA a été réalisé sur tous les échantillons. La présence d'un peptide de clivage de la Lf (G-12-I) a été analysée en western blot. Les résultats obtenus montrent que les plasmas séminaux des patients séropositifs ont une plus grande capacité à stimuler la sécrétion de CCL20 que les patients séronégatifs pour le VIH. La concentration de la Lf dans le plasma séminal est corrélée à la stimulation de cette sécrétion par les cellules HEC-1A. Il semble que les échantillons ayant la plus grande capacité à stimuler la sécrétion de CCL20 possèdent une plus forte concentration en peptide de clivage de la Lf (G-12-I), bien que ce résultat, obtenu en western blot. La salive est également capable de stimuler la production de CCL20 par les cellules HEC-1A, mais cette stimulation n'est pas corrélée avec sa concentration en Lf. Nous concluons que la sécrétion de CCL20 par l'épithélium génital féminin induite par le plasma séminal est corrélée à la présence de la Lf dans ce fluide. Bien que les mécanismes puissent être différents, la salive peut également induire la production de CCL20 par les cellules épithéliales de la muqueuse génitale féminine.

Mots-clés: 1. SIDA, 2. VIH 3. Transmission sexuelle; 4. La lactoferrine, 5. G-12-I, 6. CCL20 7. Le plasma séminal; 8. La salive 9. Le fluide vaginal, 10. Les cellules épithéliales endocervicales

ABSTRACT

Lourenço A.G. **In vitro study of the capacity of lactoferrin and its cleavage product (G-12-I), present in oral and genital secretions, to modulate the production of CCL20 by the endocervical epithelial cells: Involvement with the sexual transmission of HIV.** 2011. 157f. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Dendritic cells, among them Langerhans cells, are recognized as presenters of Human Immunodeficiency Virus (HIV) to CD4 + T lymphocytes. The recruitment of Langerhans cells in the vaginal mucosa is modulated by Chemokine CC motif ligand 20 (CCL20) produced by epithelial cells of the female genital mucosa. The aim of this study was to evaluate the capacity of seminal plasma, saliva and vaginal secretions to induce the production of CCL20 by monostratified endocervical epithelium cells culture (HEC-1A), also, the relation of this production with the presence of lactoferrin and its cleavage products (G-12-I) in seminal plasma and saliva. Cultures of HEC-1A cells were stimulated with seminal plasma, saliva and vaginal secretions of HIV-seronegative and HIV-seropositive participants, and the CCL20 production measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) in its cellular supernatant. ELISA for Lf was performed on all samples, and the peptide cleavage Lf (G-12-I) observed in the samples which more and less induced the CCL20 secretion on western blot. We observed that the seminal plasma of seropositive participants were responsible for a higher stimulation of CCL20 production by HEC-1A cells, when compared to the seminal plasma of HIV-seronegative participants. Lf concentration in seminal plasma was positively related to the CCL20 production by HEC-1A cells, the higher production of CCL20 was also more associated with Lf peptide cleavage Lf (G-12-I), on western blot. Saliva stimulated CCL20 production by HEC-1A cells, and such stimulation was not correlated to Lf concentration. In conclusion, the presence of Lf in seminal plasma positively related to the production of CCL20 by HEC-1A cells, and saliva may induce the production of CCL20 in the female genital mucosa.

Keywords: 1. AIDS; 2. HIV; 3. Sexual transmission; 4. Lactoferrin; 5. G-12-I; 6. CCL20; 7. Seminal plasma; 8. Saliva; 9. Vaginal discharge; 10. Endocervical epithelial cells.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	33
3 POPULAÇÃO, MATERIAL E MÉTODO	35
3.1 Casuística	36
3.2 Avaliação clínica dos participantes	37
3.2.1 Anamnese	38
3.2.2 Exame clínico	38
3.2.3 Exame periodontal	39
3.3 Coleta de fluidos corpóreos	40
3.3.1 Coleta da saliva	40
3.3.2 Coleta de sangue	41
3.3.3 Coleta da secreção vaginal	41
3.3.4 Coleta do plasma seminal	41
3.4 Cultura de células do epitélio monoestratificado endocervical (HEC-1A)	42
3.5 Estimulação das células do epitélio monoestratificado endocervical (HEC-1A).	42
3.6 Dosagem de CCL20 por teste imunoenzimático (ELISA)	43
3.7 Dosagem da Lf por ELISA	44
3.8 Dosagem de proteína total	44
3.9 Carga viral	45
3.10 Western blot	45
3.11 Cromatografia por afinidade do plasma seminal	47
3.12 Análise estatística	48
4 RESULTADOS	49
4.1 Resultados referentes ao estudo do plasma seminal	50
4.1.1 Características gerais dos participantes:	50

4.1.2 Estudo da produção de CCL20 por cultura de células HEC-1A estimuladas com plasma seminal de participantes soronegativos para o HIV.	50
4.1.3 Estudo da produção de CCL20 pelas células HEC-1A estimuladas com plasma seminal de participantes soropositivos e soronegativos para o HIV.	51
4.1.4 Concentração de proteína total e de lactoferrina no plasma seminal de participantes soronegativos e soropositivos para o HIV.	52
4.1.5 Correlação entre carga viral do plasma seminal e sua capacidade de estimular a produção de CCL20 pelas células HEC-1A.	54
4.1.6 Correlação entre estimulação da produção de CCL20 pelas células HEC-1A e concentração de proteínas totais no plasma seminal.	55
4.1.7 Correlação entre estimulação da produção de CCL20 pelas células HEC-1A e concentração de lactoferrina no plasma seminal.	58
4.1.8 Capacidade do peptídeo G-12-I, proveniente da clivagem da lactoferrina, de induzir a produção de CCL20 pelas células HEC-1A.	62
4.1.9 Separação protéica do plasma seminal por cromatografia de afinidade.	63
4.2 Resultados referentes ao estudo da saliva	67
4.2.1 Estudo da produção de CCL20 pelas células HEC-1A estimuladas com saliva de participantes soronegativos para o HIV.	67
4.2.2 Estudo da produção de CCL20 pelas células HEC-1A estimuladas com saliva de participantes soropositivos e soronegativos para o HIV.	68
4.2.3 Concentração de proteína total salivar de participantes soropositivos e soronegativos para o HIV.	70
4.2.4 Concentração de lactoferrina salivar em participantes soropositivos e soronegativos para o HIV.	71
4.2.5 Correlação entre a concentração de Lf e de proteína total salivar com a produção de CCL20 pelas células HEC-1A estimulada pela saliva.	72
4.2.6 Capacidade dos peptídeos G-12-I, provenientes da clivagem da lactoferrina, de induzirem a produção de CCL20 pelas células HEC-1A estimuladas com saliva de participantes soropositivos para o HIV.	74
4.3 Resultados referentes ao estudo da secreção vaginal	76
4.3.1 Características gerais dos participantes	76
4.3.2 Estudo da produção de CCL20 pelas células HEC-1A estimuladas com secreção vaginal de participantes soronegativas para o HIV.	76
4.3.3 Concentração de proteína total e de lactoferrina na secreção vaginal de participantes soronegativos e soropositivos para o HIV.	77

5 DISCUSSÃO	79
6 CONCLUSÃO	92
REFERÊNCIAS	95
ANEXOS	115
ARTIGOS	122

1 INTRODUÇÃO

A síndrome da imunodeficiência adquirida foi descrita pela primeira vez em 1981, nos Estados Unidos, entre homens que faziam sexo com homens, nos quais se verificou o aparecimento de múltiplos casos de Sarcoma de Kaposi e Pneumonia por *Pneumocistis jiroveci* (na época conhecida como *Pneumocistis carinii*), doenças previamente conhecidas, mas que até então apresentavam características peculiares (GOTTLIEB et al., 1981). O Sarcoma de Kaposi, por exemplo, era descrito, principalmente, em pacientes idosos e a pneumonia por *Pneumocistis carinii* em pacientes com câncer em estágio avançado. Após o surgimento dessas doenças em pacientes previamente saudáveis os *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), órgão de vigilância epidemiológica americano, passou a estudar e definir o perfil clínico e epidemiológico da nova doença. Essa investigação conduziu à hipótese de uma perturbação do sistema imunológico celular, ocasionada por uma doença não classificada, de etiologia infecciosa e transmissível (CDC, 1982). De 1981 a 1982, o CDC notificou 593 casos de aids, configurando a dimensão epidêmica de uma nova doença nos Estados Unidos. No Brasil, os primeiros casos de aids foram relatados em 1982 em sete homens que faziam sexo com homens (CASTILHO; CHEQUER, 1997). O aparecimento dessa doença em homens que faziam sexo com homens levou à designação inicial e preconceituosa de “peste gay”, ou seja, uma doença estritamente associadas à atividade homossexual e que, ao ver da sociedade, estava relacionada a atos sexuais “anormais” e a um estilo de vida libertino. Com o decorrer dos anos e aquisição de maiores conhecimentos sobre a epidemiologia da doença, esse comportamento sexual passou a não ser o unicamente implicado, observando-se crescimento vertiginoso de casos entre casais heterossexuais e usuário de drogas ilícitas injetáveis (SZWAREWALD; BASTOS; CASTILHO, 1997).

Atualmente, a aids atinge indistintamente pessoas de todas as classes sociais, de todas as faixas etárias e opções sexuais. Segundo a *Joint United Nations Programme on HIV/AIDS* (UNAIDS) existem 33,4 milhões de casos de aids em todo o mundo. Somente em 2008, foram relatados 2,7 milhões de novos casos, e mais de dois milhões de mortes em decorrência da aids (UNAIDS, 2010). No Brasil, o número de casos notificados de 1980 a 2009 foi de 544.846. Uma pesquisa feita em 2004 estimou 593.000 casos de aids no Brasil. Em 2006, foram registrados 35.459 novos casos da doença e em números absolutos registrou-se 217.091 óbitos de 1980 à 2008 (BRASIL, 2010).

Em 1983, três anos após a descrição dos primeiros casos de aids, pesquisadores franceses e americanos isolaram seu agente causador a partir de biopsias ganglionares de um paciente em estágio pré-aids. Tratava-se do vírus da imunodeficiência humana (HIV) que foi denominado inicialmente como vírus associado à linfadenopatia (BARRÉ SINOUSI et al.,

1983; KLATZMAN et al.; 1984) e, posteriormente como vírus humano T-linfotrópico - III (GALLO; SLISKI; WONG-STAAAL, 1983) ou retrovírus associado à aids (LEVY et al., 1984). A denominação HIV foi definida somente na Conferência de Paris em 1986 (COFFIN et al., 1986).

Em 1986, foi descrito em pacientes africanos um novo vírus causador da aids, denominado de HIV-2. (CLAVEL et al., 1986). Diferentemente do HIV-1 que está distribuído por todo o globo terrestre, o HIV-2 está presente principalmente na África ocidental. Apesar de possuírem diferenças quanto à estrutura genômica e à distribuição geográfica, ambos podem causar síndromes clínicas semelhantes, embora o potencial patogênico do HIV-2 seja inferior ao do HIV-1, e, portanto, associado a uma menor carga viral e a queda mais lenta da contagem de linfócitos T CD4⁺ (LTCD4⁺), culminando em maior período de latência clínica (BOCK; MARKAVITZ, 2001; O'SHAUGHNESSY; SCHETER, 1994; REEVES; DOMS, 2002).

O HIV é um *Lentivirus*, gênero pertencente à família *Retroviridae*, a qual possui a característica de infectar primariamente células do sistema linfocitário e mononuclear fagocitário podendo acometer também o sistema nervoso (AMATO et al., 1996; WAINBERG; JEANG, 2008). O HIV tem estrutura icosaédrica de aproximadamente 110 nanômetros de diâmetro, constituída de um envoltório viral fosfolipídico, onde estão inseridas proteínas das células hospedeiras e virais, incluindo duas principais, a gp 120 e a gp 41, associadas entre si de forma não covalente, conforme esquema da figura 1 (BARRÉ-SINOUSSE, 1996; SIERRA; KUPFER; KAISER, 2005).

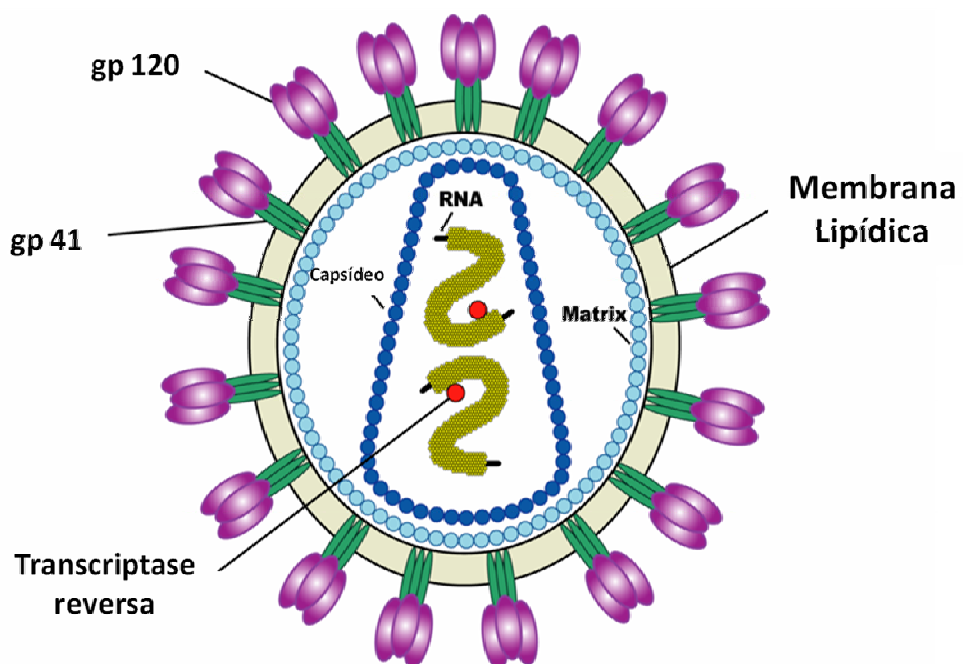


Figura 1. Estrutura do HIV. Adaptado de National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID, 2011).

O HIV possui duas moléculas de ácido ribonucléico (RNA) de fita simples com orientação positiva e genoma proviral com três genes estruturais: *gag*, *pol* e *env* que codificam as proteínas do núcleo, as enzimas virais e as proteínas internas e externas do envelope, respectivamente (BARRÉ-SINOUSI, 1996; GALLO et al., 1988; SIERRA; KUPFER; KAISER, 2005).

O HIV infecta principalmente os linfócitos T que exprimem o receptor CD-4 em sua membrana plasmática, no entanto, também é capaz de infectar macrófagos e células dendríticas que representam um importante reservatório para o vírus (CHUN et al., 1997; LARSSON et al., 2002; SISPAS et al., 1997).

Como pode ser visto na figura 2, a replicação do HIV inclui como etapas: 1- Fusão viral com os receptores de superfície das células hospedeiras e penetração do RNA viral no citoplasma. 2- Transcrição do RNA viral em ácido desoxirribonucléico (DNA) viral pela transcriptase reversa. 3- Migração do DNA viral para o núcleo celular. 4- Síntese de RNA mensageiro (RNAm) e das proteínas virais. 5- Exocitose e maturação extracelular do vírion (FAN; CONNER; VILLARREAL, 1994).

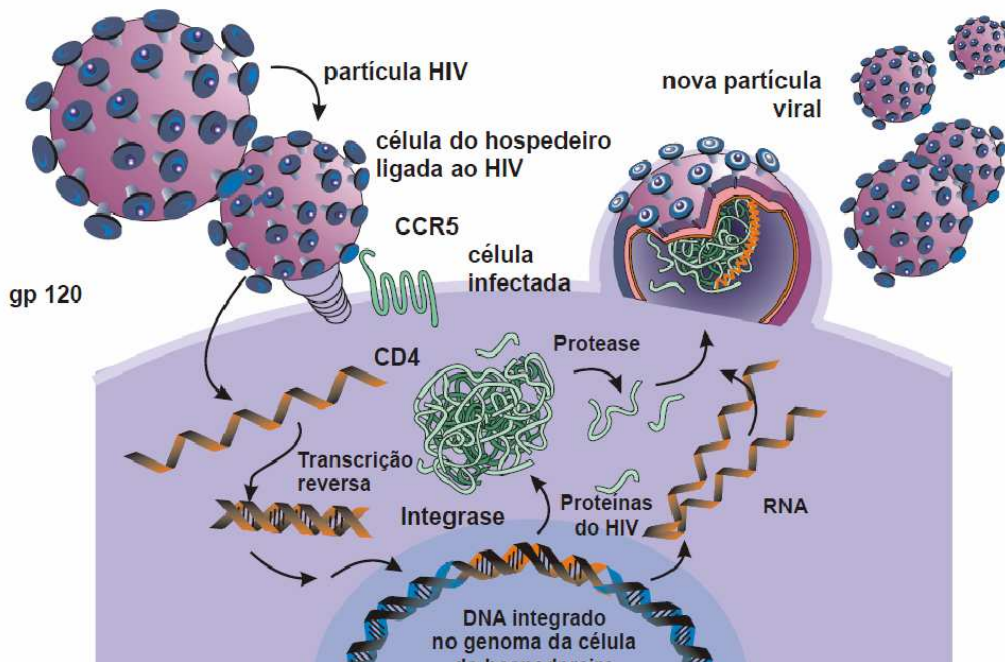


Figura 2. Replicação do HIV. Adaptado de Weiss, 2001.

Para ocorrer a infecção pelo HIV, a proteína viral *gp 120*, localizada no envelope viral, reconhece e liga-se ao receptor CD4 que é expresso principalmente na superfície de linfócitos T auxiliares. No entanto, outras células que também expressam o receptor CD4⁺ podem ser infectadas, como as células dendríticas da micróglia e macrófagos (LEVY, 1990;

MILLER, 1997). Outras moléculas de superfície também participam da ligação da *gp* 120 aos receptores CD4, como a *C-X-C chemokine receptor type 4* (CXCR4), receptores de β -quimiocinas, e a *C-C chemokine receptor type 5* (CCR5), receptores de α -quimiocinas (DOMS, 2001; GUATELLI et al., 2002).

Após a ligação da *gp* 120 viral com o receptor CD4⁺, outra proteína viral, conhecida como *gp*41, facilita a fusão do vírus à membrana celular permitindo a entrada do genoma viral no citoplasma celular (DOMS, 2001).

Introduzido o genoma viral no citoplasma celular da célula hospedeira, a enzima transcriptase reversa transcreve o RNA viral em DNA proviral de fita dupla. Essa transcrição ocorre sem mecanismos de correção, gerando uma elevada taxa de mutagênese. Estima-se que ocorram até 10 trocas de bases no genoma viral por replicação (AMATO et al., 1996; PINTO; STRUCHINER, 2006). O DNA proviral é transportado para dentro do núcleo celular onde é integrado ao DNA cromossomal do hospedeiro, mediado pela integrase viral (FREED; MARTINS, 2001; GURTNER, 1996; LEVY, 1995; PINTO; STRUCHINER, 2006). O genoma viral, integrado ao genoma do hospedeiro, pode permanecer em estágio de latência durante anos ou continuar a fase replicativa. Para se “esconder” do sistema imunitário o vírus deixa de efetuar a expressão protéica, tornando-se transcricionalmente inativo, visto que não há sinal de sua presença (AMATO et al., 1996).

O DNA proviral integrado ao genoma do hospedeiro induz a produção de RNAm sob controle de fatores de transcrição da célula hospedeira, que conduzirá a transcrição das proteínas virais no citoplasma celular. As poliproteínas produzidas no processo anterior são transportadas por vias independentes para a membrana celular onde as partículas da progênie viral brotarão para o exterior da célula levando consigo parte da membrana celular que participa da formação de seu envelope (AMATO et al., 1996).

Na fase de exocitose dos vírions, as partículas virais liberadas são imaturas, e completarão seu processo de maturação fora da célula hospedeira, devido a proteólises geradas nos próprios vírions (FREED; MARTINS, 2001). A maturação dos vírions é resultado da clivagem proteolítica das proteases virais (LOCHRIE et al., 1997).

Desde sua descoberta o HIV é conhecido como um vírus capaz de infectar e destruir células que apresentem a glicoproteína CD4 de 55 KDa, dentre essas células estão os LTCD4⁺, células de origem monocitária (BARRE-SINOSSI, 1988), células epiteliais (McDOUGAL et al., 1986) monócitos, macrófagos, células dentríticas e as células de Langerhans (BRAATHEN et al., 1987; BRAATHEN, 1988). A molécula do CD4 possui quatro domínios, D1 à D4, que interagem com a glicoproteína *gp* 120 no domínio *CD4*

Binding Site , essa interação forte, afinidade de 1 à 10 nM (UGOLINI; MONDOR; SATTENTAU, 1999), é essencial para a infecção das células CD4⁺, no entanto, somente a presença da molécula CD4 não é suficiente para o sucesso da infecção, sendo necessárias uma série de eventos que implicarão nas ligações com os co-receptores culminando com a entrada do HIV nas células hospedeiras (BATES, 1996).

Os co-receptores são quimiocinas, sendo as CXCR4 e CCR5 (CXC e CC quimiocinas, receptores 4 e 5 respectivamente) as principais. O tropismo do vírus é determinado por sua afinidade com uma ou ambas dessas moléculas (CHOE et al., 1996; SIMMONS et al., 1996; UGOLINI et al., 1997; WU et al., 1997). Indivíduos que apresentam mutações no co-receptor CCR5 apresentam uma forte resistência à infecção pelo HIV, o que demonstra a importância dessas proteínas para o sucesso da infecção pelo HIV (GALLO; MONTAGNIER, 2003).

O domínio V3-loop da *gp* 120 do HIV-1 é carregada positivamente, o que lhe confere capacidade de se fixar em estruturas negativamente carregadas como a molécula *heparan sulfate proteoglycan* (HSPG). A molécula *gp* 120 é igualmente capaz de se fixar nas moléculas de adesão (*leukocyte function-associated - 1* e *intercellular adhesion molecule 3*), *galactosyl ceramide* (GalCer) e as lectinas ,especialmente os receptores manoses presentes nas superfícies de macrófagos (Figura 3). Essas interações adicionam efeito sinérgico à infecção pelo HIV. Estudos que conseguiram bloquear cada uma dessas proteínas mostraram que as células alvo perdem substancialmente sua permissividade à infecção para o HIV (UGOLINI; MONDOR; SATTENTAU, 1999).

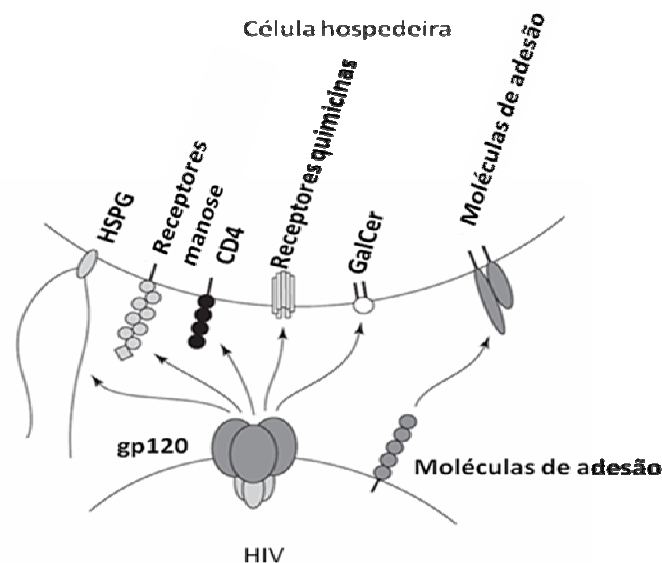


Figura 3: Ligação da *gp* 120 em diferentes receptores celulares. Esquema adaptado de UGOLINI; MONDOR e SATTENTAU (1999).

HSPG: Heparan sulphate proteoglican.

GalCer: Galactosyl ceramide.

HIV: Vírus da imunodeficiência humana.

Os macrófagos e as células dendríticas são as primeiras células infectadas pelo HIV, principalmente pelas cepas R5 trópicas. Uma vez infectadas, elas constituem um reservatório importante do vírus, sendo muitas vezes responsáveis pela transmissão do HIV para outras células. Os diferentes tipos de macrófagos que estão fora dos órgãos linfóides, chamados macrófagos tissulares, como os encontrados nos pulmões (macrófagos alveolares), no fígado (células de Kupffer), na placenta (células de Hofbauer) e no sistema nervoso (micróglia), são permissivos ao HIV e constituem outros reservatórios importantes para o vírus (CARR et al., 1999).

As células dendríticas, células apresentadoras de antígeno, principalmente de origem viral, são igualmente permissivas ao HIV (cepas X4 e R5). A molécula de superfície conhecida por *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin* (DC-SIGN), presente nas células dendríticas, são responsáveis pela fixação do HIV e pela posterior apresentação aos linfócitos T, levando ao sucesso da infecção viral (BHOOPAT et al., 2001).

A manifestação clínica inicial produzida na infecção aguda pelo HIV, conhecida como síndrome retroviral aguda, é semelhante à mononucleose infecciosa e ocorre de cinco a trinta dias pós-exposição ao HIV (SCHACKER et al., 1998), sendo caracterizada pela presença de febre, sudorese, mal estar, náuseas, linfadenopatias, faringite, fadiga, ulcerações orais e exantema maculopapular, entre outras manifestações clínicas (CLARK et al., 1991).

O período médio entre a aquisição do HIV e o aparecimento da aids é de oito a dez anos. Esse período, geralmente assintomático, é denominado de latência clínica (GUATELLI et al., 2002). Entretanto, nesse período, podem surgir sinais e sintomas inespecíficos de linfadenopatia generalizada, febre baixa, sudorese noturna e diarreia (METROCA et al., 1983).

Em apenas 5% das pessoas infectadas a progressão da aids ocorre rapidamente: de um a dois anos. Mesmo nos casos em que a progressão da doença é mais lenta, reduzem-se a contagem de $LTCD4^+$ em 30 a 60 células por milímetro cúbico ($cél/mm^3$) por ano. A ocorrência de eventos clínicos como a leucoplasia pilosa oral, a candidíase oral e vaginal e a reativação do herpes zoster, podem ser sinais da progressão da doença (GUATELLI et al., 2002).

O *esgotamento* do sistema imune com relação à sua capacidade de deter a replicação contínua do HIV antecede o aparecimento da aids. A partir deste momento, ocorre o declínio acentuado da imunidade celular em número e qualidade de resposta, abrindo espaço para

diversas doenças oportunistas (CIMERMAN; LOMAR; LEWI, 2004). O maior risco para o aparecimento de doenças oportunistas ocorre quando a contagem de LTCD4⁺ encontra-se abaixo de 200 cél/mm³ (GUATELLI et al., 2002; UIP; TEIXEIRA, 2004). Atualmente, consideram-se doenças oportunistas indicadoras de aids aquelas listadas na tabela 1.

Tabela 1 - Doenças indicadoras de aids, CDC (1993).

•	Criptosporidiose
•	Pneumonia por <i>Pneumocystis jiroveci</i>
•	Toxoplasmose
•	Candidíase esofágica, brônquica ou de pulmões
•	Criptococcose
•	<i>Mycobacterium avium</i> (disseminado)
•	<i>Mycobacterium kansasii</i>
•	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (extrapulmonar e pulmonar)
•	Cytomegalovirus
•	Herpes simplex
•	Leucoencefalopatia multifocal progressiva
•	Isosporíase
•	Sarcoma de Kaposi em indivíduos < 60 anos
•	Linfoma não-Hodgkin
•	Coccidioidomicose
•	Encefalopatia por HIV
•	Síndrome consumptiva associada ao HIV
•	Bacteremia por salmonella recorrente
•	Histosplamose
•	Câncer cervical invasivo

Em 1993, o CDC classificou a infecção pelo HIV e a aids em nove categorias segundo dados clínicos e contagem de LTCD4⁺ dos pacientes, como mostrado na Tabela 2 (DORE; COOPER, 1997). Ainda pela mesma classificação do CDC, são considerados indivíduos clinicamente com aids os que se enquadram nos grupos A3, B3, C1, C2 e C3. Àqueles indivíduos pertencentes aos grupos A1, A2, B1 e B2, encontram-se em estágios que precedem o surgimento da aids.

Tabela 2 - Classificação da infecção pelo HIV/aids, segundo o CDC (1993).

Categorias laboratoriais	Categorias clínicas		
	(A) Assintomático, ou infecção primária pelo HIV ou PGL	(B) Sintomático não A não B	(C) Condições indicadoras de aids
1. ≥ 500 cél/mm ³	A1	B1	C1
2. 200 - 499 cél/mm ³	A2	B2	C2
3. <200 cél/mm ³	A3	B3	C3

Cél/mm³: Células por milímetro cúbico.

HIV: Vírus da imunodeficiência humana.

PGL: Linfadenopatia generalizada persistente

Os principais meios de transmissão do HIV são:

- Transmissão por sangue contaminado: O HIV pode ser transmitido através do sangue ou por seus produtos derivados (GRANDO et al., 2002).
- Transmissão por meio de agulhas ou seringas contaminadas: Se dá principalmente em usuários de drogas injetáveis que compartilham seringas ou agulhas contaminadas com sangue contendo o HIV (O'BRIEN; SHAFFER; JAFFE, 1995).
- Transmissão ocupacional: Transmissão do HIV de um paciente portador do vírus para um profissional de saúde, por exemplo, perfuração acidental por agulha durante procedimento cirúrgico ou em uma punção venosa. Estudos mostram que o risco de contaminação neste tipo de acidente é inferior a 1% (BELL, 1997).
- Transmissão vertical: Transmissão do HIV da mãe para filho durante a gestação, parto ou amamentação. Cuidados pré-natais, no parto e pós-natais, reduzem significativamente o risco de transmissão vertical (COOVADIA, 2004).
- Transmissão sexual: Ocorre pelo ato sexual sem o uso de preservativos no qual haja contato direto com sangue, sêmen ou secreções genitais contaminados pelo HIV.

Predominantemente, a transmissão heterossexual acontece por via mucosa, por meio de contato com partículas virais livres ou com células infectadas (monócito-macrófago e linfócitos T) presentes no sêmen e no fluido vaginal.

As mucosas, dentre elas, a mucosa oral, a mucosa dos órgãos genitais, reto e trato intestinal, são permissíveis a entrada do HIV. Cada epitélio mucoso possui característica

própria capaz de influenciar a penetração do HIV, dentre essas as mais importantes são (WAHL; SMITH; JANOFF, 1999):

- Localização anatômica: A localização anatômica determina o grau de exposição da mucosa ao sêmen infectado pelo HIV.
- Espessura: Determina sua eficácia como barreira física.
- Presença de células alvo: A natureza e quantidade de células alvo influenciam na apresentação do HIV para os tecidos subjacentes e para células imunitárias do hospedeiro.
- Capacidade de permitir a passagem de macromoléculas, assim como o HIV, pelo mecanismo de transcitose (BOMSEL, 1997).

O trato genital feminino é revestido por epitélio mucoso, sem camada córnea, e, portanto, sem células queratinizadas, e está dividido em duas zonas, em função de sua anatomia e estrutura histológica:

Trato inferior: se estende da vulva ao exo-colo uterino, incluindo a vagina. Ele é revestido por um epitélio pluriestratificado, que embora espesso, pode permitir a penetração do HIV por apresentar uma grande circulação de células imunitárias (MILLER; MCCHESENEY; MOORE, 1992). O epitélio mucoso vaginal e o endocervix são constituídos de um epitélio pluriestratificado não queratinizado e possuem uma superfície, em média, 15 vezes maior que a mucosa endocervical, sendo mais suscetíveis a sofrerem microtraumatismos durante o ato sexual, o que favorece a penetração do HIV. As células do epitélio pluriestratificado vaginal não exprimem o receptor CD4, no entanto, são capazes de exprimir GalCer, assim como, CXCR4 ou CCR5. Diferentes células alvo estão presentes na mucosa vaginal: as células de Langerhans intra-epiteliais estão preferencialmente localizadas no nível da mucosa basal ou para-basal e na lâmina própria na ordem de 30 células/mm². Linfócitos intra-epiteliais estão igualmente presentes (BJERCKE et al., 1983).

A maior taxa da transmissão do HIV, ao nível da mucosa vaginal, acontece na região do colo do útero, onde se encontra os dois tipos de epitélio mucoso vaginal, também conhecido como zona de transição (PUDNEY; QUAYLE; ANDERSON, 2005). Na zona de transição encontra-se a maior densidade de células alvo para o HIV, em especial as células de Langerhans e linfócitos intra-epiteliais e submucosos (PUDNEY; QUAYLE; ANDERSON, 2005).

Por sua vez, o trato superior está compreendido entre o endocolo e os ovários, incluindo o útero. Ele é revestido por um epitélio monoestratificado, e, portanto, mais susceptível à passagem do HIV, por sua espessura reduzida. A mucosa cervical é composta por três tipos de epitélio: mucosa exocervical, zona de transição e mucosa endocervical. A mucosa exocervical se assemelha à mucosa vaginal, tendo, portanto, uma grande densidade de células de Langerhans e de LTCD4⁺. As células de Langerhans estão situadas na parte superior suprabasal com prolongamentos citoplasmáticos que podem atravessar a mucosa pluriestratificada, apresentando-se na superfície epitelial. Segundo alguns estudos, as células epiteliais do exocervix podem exprimir taxas variáveis de co-receptores CXCR4 e CCR5 (McCLURE et al., 2005; YEAMAN et al., 2003).

Na mucosa endocervical estão presentes as células epiteliais que exprimem CD4, LTCD4⁺ intra-epiteliais e células que exprimem quimiotaxinas específicas para as células de Langerhans (LEHNER, 1991). Devido à presença de células alvo para o HIV, a mucosa endocervical é vulnerável à entrada desse vírus (HOWELL, 1997).

O HIV que está presente no sêmen masculino, sob a forma de partículas virais livres ou integradas às células *non spermatozoal mononuclear cells* (NSMC), é capaz de ultrapassar a mucosa genital feminina *in vitro* (ALFSEN et al., 2005, MURATORI et al., 2007). Os espermatozoides não são infectados pelo HIV, no entanto, possuem receptores de superfície (GalAAG), que permitem a fixação das partículas virais. Embora o HIV seja sensível ao pH ácido, como o pH vaginal, é possível que as células infectadas pelo HIV protejam esse vírus, tornando-os mais resistentes que as partículas virais livres (O'CONNOR et al., 1995; ONGRADI et al., 1990).

Existem várias hipóteses sobre a entrada do HIV pelas mucosas. As principais são: passagem por rupturas do epitélio mucoso vaginal, transcitose, infecção de leucócitos intra-epiteliais, infecção de células epiteliais, captura e transferência do HIV por células imunitárias do hospedeiro, transmigração e infecção das células epiteliais.

As células infectadas pelo HIV ou suas partículas virais livres têm acesso direto à região submucosa pela ruptura do epitélio mucoso vaginal, onde encontrarão suas células alvo, vasos sanguíneos e linfáticos (DONCEL; JOSEPH; THURMAN, 2011).

As presenças de vaginose bacteriana, doenças sexualmente transmissíveis e candidose vulvo-vaginal aumentam a probabilidade de microtraumatismos durante o ato sexual (JONHSON; LEWIS, 2008; ROTTINGEN; CAMERON; GARNETT, 2001). Os microtraumatismos da mucosa vaginal são comuns durante o ato sexual (NORVELL; BENRUBI; THOMPSON, 1984), e, geralmente, são resultados de microabrasões, os quais

podem provocar microsangramentos elevando o risco da transmissão do HIV (GUIMARÃES; VLAHOV; CASTILHO, 1997).

As células dendríticas, dentre elas as células de Langerhans, são células alvo do HIV. A infecção das células de Langerhans pelo HIV é facilitada por seu papel sentinela no sistema imunitário mucoso, por sua localização nas camadas suprabasais do epitélio mucoso vaginal e pela presença de receptores e co-receptores para o HIV em sua membrana plasmática. As células dendríticas podem capturar o HIV e disseminá-lo às mucosas genitais subjacentes e para os tecidos linfóides onde o vírus será apresentado aos LTCD4⁺, culminando com o sucesso da infecção. Em ensaios *in vitro*, as células dendríticas são infectadas pelo HIV depois de quatro dias de cultura (DUSSERRE et al., 1992), e *in vivo*, essa transmissão é provada através de biopsias de mucosas de pacientes soropositivas para o HIV (STINGL et al., 1990). Estudos também comprovam esse meio de entrada do HIV em mucosas vaginais de macacos (MILLER, 1998). Em 2001, Bhoopat et al. mostraram a co-localização de marcadores das células de Langerhans e do HIV na mucosa vaginal de mulheres soropositivas para o HIV.

O HIV, por meio das células de Langerhans, pode utilizar-se de dois modos de disseminação: 1. Infecção das células de Langerhans com fusão das membranas virais à sua membrana celular e conseqüente replicação viral; ou, 2. Captura do HIV pelas células de Langerhans sem a sua infecção.

As células dendríticas, dentre elas as células de Langerhans, exprimem várias proteínas capazes de se ligarem à proteína gp 120 do HIV como o receptor de manose, e a DC-SIGN (TURVILLE et al., 2002). Segundo Berlier et al. (2006), a regulação e o recrutamento das células de Langerhans podem ser mediados pelo *macrophage inflammatory protein-3* (MIP3 α), também conhecido como *quimiocina C-C motif ligand 20* (CCL20). A CCL20 é implicada na formação e função do tecido linfóide mucoso via quimioatração de células dendríticas, dentre elas as células de Langerhans e linfócitos, graças à sua forte interação com o receptor CCR6 (BABA et al., 1997; DIEU-NOSJEAN et al., 2000).

A CCL20 é secretada por numerosos tecidos como a pele (CHARBONNIER et al., 1999; DIEU-NOSJEAN et al., 2000), a mucosa oral (ABIKO et al., 2003) e o epitélio vaginal (CREMEL et al., 2005). Essa quimiocina é expressa basalmente pelas células epiteliais da mucosa, no entanto, sua expressão pode ser estimulada por fatores microbianos como lipopolissacarídeos (LPS) e citocinas inflamatórias como o fator de necrose tumoral (TNF- α) e reduzida pela interleucina-10 (IL-10) (SCHUTYSER et al., 2000).

A mucosa endocervical do aparelho genital feminino é constituída por epitélio monoestratificado, que apresenta suas células unidas fortemente por junções intercelulares,

formando uma barreira física para a entrada do HIV. As células epiteliais do epitélio monoestratificado são polarizadas em polo apical (em contato com o meio externo) e polo basolateral (em contato com a mucosa subjacente). Essa polarização permite que o vírus atravesse o epitélio por transcitose, que é o mecanismo, no qual, as células do epitélio monoestratificado transportam partículas de maneira seletiva do polo apical para o polo basolateral (APODACA, 2001). Esse mecanismo é comum em tecidos epiteliais monoestratificados, como o tecido da mucosa intestinal (MENG et al., 2002), da mucosa endometrial (HOCINI et al., 2001) e da mucosa cervical (WOLBANK et al., 2003).

As células mononucleares infectadas pelo HIV são capazes de transmitir os vírions imaturos para as células epiteliais que os acondicionarão em vesículas em seu citoplasma, sem que esse se infecte pelo HIV. Os vírions acondicionados em vesículas no citoplasma das células epiteliais se mantêm em sua forma imatura até que sejam transpostos ao tecido submucoso onde completarão sua maturação (PHILLIPS, 1994). Se a transcitose do HIV sob sua forma livre foi por muito tempo controversa (BOMSEL, 1997), em 2002, Meng et al. mostraram que as partículas virais livres do HIV podem atravessar o tecido epitelial monoestratificado através da transcitose, assim como os vírions associados às células mononucleares infectadas como já descrito. Nesse mesmo trabalho os autores mostraram que células epiteliais jejunais primárias (GalCer⁺, CCR5⁺, CXCR4⁻) são capazes de internalizar o HIVR5 por meio da transcitose.

Geralmente, a transcitose da partícula viral livre é dependente da cepa viral e de suas interações com receptores da membrana apical das células epiteliais. Pode-se inibir, por exemplo, a transcitose do HIV utilizando-se anticorpos monoclonais específicos para a GalCer, inibição que pode atingir 90% quando se faz uso de anticorpos policlonais específicos para a proteína gp 160 (ALFSEN et al., 2001; ALFSEN; BOMSEL, 2002).

As células epiteliais cervicais da mucosa vaginal feminina (HeLa) são capazes de permitir a transcitose do HIV (MORIZONO; HARADA, 1998). Também as células epiteliais monoestratificadas endometriais (HEC-1A) exprimem GalCer e CXCR4, e, portanto, são mais permissivas à passagem do HIVX4 do que do HIVR5 (SAÏDI et al., 2007).

Os LTCD4⁺, na sua maioria linfócitos T de memória que exprimem CCR5, são encontrados na lâmina própria do epitélio escamoso vaginal e do ectocervix (HLADIK et al., 1999). Os linfócitos T de memória intra-epiteliais são as primeiras células infectadas pelo HIV, seguidos pelas células de Langerhans e dos macrófagos intra-epiteliais (GUPTA et al., 2002). Em 1999, Zhang et al., observaram a infecção das células T de memória intra-epitelial, células de Langerhans e macrófagos pelo HIV.

A capacidade do HIV para infectar as células epiteliais, que representam 90% das células da barreira mucosa, foi descrita em 1987 (ADACHI et al., 1987), no entanto, essa capacidade *in vivo* ainda é muito controversa (MORROW et al., 2008). Alguns estudos mostram a capacidade das células epiteliais de se infectarem e transmitirem as partículas virais do HIV às células imunitárias (HOWELL et al., 1997; PHILLIPS, 1994), no entanto, outros estudos não observam esse mecanismo de infecção (DEZZUTTI et al., 2001; FOX et al., 1989; GREENHEAD et al., 2000). Essas discordâncias de resultados podem ser explicadas, em parte, pelas diferentes origens das células epiteliais e cepas do HIV empregadas (isolados primários, cepas de laboratório, partículas livres do HIV ou associadas às células) e pelo tamanho do inóculo do agente infeccioso empregado, assim como pelos diferentes protocolos de infecção ou de revelação utilizados.

Linfócitos T e os monócitos infectados pelo HIV são capazes de atravessar o epitélio monoestratificado da mucosa endocervical através dos espaços intercelulares. Tal mecanismo se denomina transmigração. Alguns trabalhos verificaram a transmigração de linfócitos T e monócitos infectados pelo HIV utilizando linhagens de células endocervicais (CARRENO et al., 2002; MAYER; ANDERSON, 1995). A transmigração ocorre com mais frequência em condições pró-inflamatórias, onde estão aumentadas as citocinas como o fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina 1-beta (IL-1 β) e lipopolissacarídeo (LPS). Essas condições são frequentemente encontradas no trato genital feminino, e, conseqüentemente, capazes de aumentar a replicação e a transmissão do HIV (HEDGES; AGACE; SVANBORG, 1995; SHANG; ISSEKUTZ, 1999).

Em um modelo de epitélio cervical, Chancey et al. (2006), observaram que o HIV associado às células imunitárias é capaz de atravessar a barreira epitelial e que os monócitos migram cinco vezes mais do que os linfócitos. As células imunitárias infectadas pelo HIV que transmigram através do epitélio monoestratificado chegam à lâmina própria ou à região submucosa, regiões ricas em células alvo para o HIV e com tecidos linfóides associados.

A entrada do HIV pela mucosa vaginal pode ser influenciada pela presença de infecções ou por outras secreções humanas em contato com essa mucosa. As evidências científicas mostram que o plasma seminal possui um potente papel pró-inflamatório na mucosa cérvico-vaginal durante a infecção pelo HIV. Recentemente, Münch et al. (2007) relataram que a fosfatase ácida prostática, quando clivada em pequenos peptídeos forma uma rede de fibrilas amiloidais capaz de capturar partículas virais e aumentar o reconhecimento do HIV pelas células dendríticas do epitélio vaginal em até 100000 vezes.

As possíveis interações entre o plasma seminal e a mucosa vaginal têm sido alvo de recentes estudos (BERLIER et al., 2006), no entanto, pouco se sabe sobre as interações entre saliva e mucosa vaginal.

A saliva pode entrar em contato com a mucosa vaginal de diversas formas, seja pelo sexo oral, ou pelo uso dessa secreção como lubrificante. Sabe-se que a saliva está entre os lubrificantes mais utilizados durante o ato sexual (HASSAN et al., 2007; SMITH et al., 1998). Muito se estudou sobre a entrada do HIV pela mucosa oral, sobre a atividade anti-HIV da saliva e sua eventual proteção à infecção pelo HIV (MALAMUD et al., 1997), no entanto suas interações com a mucosa vaginal ainda são desconhecidas.

A saliva presente na cavidade oral, também conhecida como saliva total, é a somatória do produto das diferentes glândulas salivares (parótida, submandibular, sublingual e glândulas salivares menores), fluido crevicular gengival, elementos do transudato plasmático derivados da rede capilar da mucosa bucal, produtos do metabolismo da flora bucal, células bacterianas e células epiteliais descamadas (LÜ; JACOBSON, 2007). A saliva possui um importante papel na defesa e na proteção dos tecidos bucais, o que corrobora com a observação de maiores índices de alterações bucais em pacientes que apresentam redução da secreção salivar, dentre as alterações bucais associadas à redução da secreção salivar ou xerostomia pode-se destacar a cárie, as fissuras mucosas e o despapilamento da língua (SONIS; FAZIO; FANG, 1996).

A saliva possui conhecida atividade inibidora do HIV, constituindo-se um fluido considerado de baixa infectibilidade para esse vírus. Estudos têm mostrado que a saliva contém menos de uma cópia de HIV viável por mililitro (MALAMUD et al., 1997). Muitas são as proteínas que atuam na defesa inata da saliva, dentre as principais, pode-se destacar as mucinas, lactoferrinas (Lf), defensinas e a enzima inibidora de protease secretada por leucócitos (cujá sigla em inglês é SLPI) (KAZMI et al., 2006; SCHENKELS; VEERMAN; AMERONGEN, 1995).

As mucinas são proteínas que proporcionam características visco-elásticas às secreções mucosas. São altamente glicosiladas, com 50% a 90% de açúcar em seu peso molecular. A capacidade das mucinas de proteger a superfície epitelial dos ataques proteolíticos de microorganismos depende largamente de sua capacidade de formar uma camada gelatinosa junto às outras proteínas salivares (SCHENKELS; VEERMAN; AMERONGEN, 1995).

A Lf é uma glicoproteína de ligação metálica da família das transferrinas. Esta glicoproteína, de 80 kDa, exibe atividade bacteriostática e bactericida contra diversos

microorganismos patogênicos. O exato mecanismo pelo qual a Lf inibe a atividade do HIV ainda é incerto, mas é conhecido que a ligação de seu domínio V3 com a proteína de envelope *gp* 120, pode atuar dificultando a transmissão desse vírus (KAZMI et al., 2006).

As defensinas, por sua vez, são pequenos peptídeos catiônicos ricos em cisteína com propriedades antimicrobiana, antiviral e imunomodulatória. Essas defensinas são divididas em defensinas α e β , baseadas na distribuição dos resíduos de cisteína. Seis α -defensinas e quatro β -defensinas humanas já foram identificadas. Estudos recentes mostram que as defensinas contribuem para as defesas antimicrobianas de diferentes maneiras, sugerindo sua capacidade de inibir múltiplos patógenos e atuando em múltiplos estágios da infecção microbiana (HAZRATI et al., 2006).

O espectro antimicrobiano das defensinas α abrange bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, leveduras e fungos filamentosos e inibem diferentes vírus como os adenovírus, os herpesvírus, o vírus influenza, e, possivelmente o HIV (DUNSHE et al., 2001; WEINBERG; QUINONES-MATEU; LEDERMAN, 2006). Enquanto as propriedades antifúngicas e antibacterianas das defensinas não estão completamente estabelecidas, novos estudos sugerem que as defensinas atuem com o sistema imune adaptativo orquestrando a vigilância imune por meio da maturação das células dendríticas, recrutando estas células ainda imaturas e as células T pela interação com o receptor CCR6, podendo ativar essas células via receptor Toll-like 4 (WEINBERG; QUINONES-MATEU; LEDERMAN, 2006).

O SLPI é uma proteína, de 11,7 kDa, produzida e secretada primariamente em células epiteliais de superfícies mucosas (oral, respiratória e genital), pele, neutrófilos e macrófagos estimulados por LPS. Estudos apontam que células do epitélio oral expressam SLPI e que essa expressão pode ser aumentada pela presença de LPS e de diferentes microorganismos e citocinas pró-inflamatórias (JANA; GRAY; SHUGARS, 2005). O SLPI participa da defesa da mucosa reduzindo a inflamação, suprimindo a produção de metaloproteinases, bloqueando a atividade de crescimento de bactérias, fungos e vírus (JANA; GRAY; SHUGARS, 2005; KAZMI et al., 2006).

Em relação ao sêmen masculino, um homem saudável produz de um a cinco mililitro de sêmen por ejaculação, com pH em torno de 7,2 à 8,0. (GLINA; VIEIRA, 2010). O plasma seminal, que é produzido pela vesícula seminal, próstata e glândulas bulbouretrais, fornece um meio de nutrição e de proteção aos espermatozóides enquanto percorrem o trato reprodutor feminino. O pH do plasma seminal tem como objetivo neutralizar o pH ácido da mucosa vaginal feminina, que é danoso aos espermatozóides (DONCEL; JOSEPH; THURMAN, 2011).

A presença do HIV no sêmen e no sangue foi evidenciada desde os primórdios da história da infecção pelo HIV em 1980 (KALICHMAN et al., 2008). O sêmen representa o principal vetor de transmissão do HIV em todo o mundo. Nele encontramos três associações virais viáveis à infecção: partículas virais livres, partículas virais associadas aos leucócitos infectados e aos espermatozóides (DONCEL; JOSEPH; THURMAN, 2011).

A infectibilidade do sêmen é influenciada por fatores como estágio da doença e tempo de soropositividade para o HIV. A carga viral do HIV no plasma seminal se apresenta em maiores índices no início e em estágios avançados da infecção pelo HIV. Sua carga viral apresenta picos da ordem de $4,5 \pm 0,4 \log_{10}$ cóp/ml na infecção inicial, estabilizando-se aproximadamente após 16 semanas de infecção pelo HIV (DONCEL; JOSEPH; THURMAN, 2011).

Outros fatores como a co-infecção pelo herpes vírus tipo 2 (HSV-2) podem colaborar para o aumento da carga viral do HIV no plasma seminal (DONCEL; JOSEPH; THURMAN, 2011).

A capacidade de estimar os riscos da transmissão sexual é baseada no conhecimento da carga viral do plasma sanguíneo e na sua magnitude na relação com a carga viral do plasma seminal. No entanto, a relação entre essas cargas virais podem ser discordantes (KALICHMAN et al., 2008; MARCELIN et al., 2008), devido ao mecanismo denominado de compartimentalização (QUINN, 2000).

Um compartimento é definido como um sítio celular ou tissular com aspectos peculiares que determinaram as características do vírus como sua penetração e replicação. Compartimentalização anatômica das variantes do HIV foram descritas no sangue (LIUZZI et al., 2003), sistema nervoso central (GÜNTARD et al., 2001), trato genital (GÜNTARD et al., 2001; KIESSLING, 1992; LIUZZI et al., 2003) mucosa retal (Di STEFANO et al., 2001), pulmões (SINGH et al., 1999) e saliva (LIUZZI et al., 2003).

O uso de antirretrovirais (ARV) propiciou uma redução nos casos de transmissão vertical do HIV, no entanto, tal redução ainda não está esclarecida quanto à transmissão sexual. Desta forma, pessoas com níveis de viremia reduzidos em consequência do uso de ARV podem permanecer infectantes para seus parceiros devido à compartimentalização do HIV no sêmen (QUINN, 2000). Novos estudos que avaliem os efeitos dos ARV na transmissão sexual, principalmente no que tange à compartimentalização dos níveis virais nas secreções genitais, são necessários (QUINN, 2000).

O próprio sêmen pode apresentar diferentes compartimentos para o HIV. As células alvo presentes no sêmen infectado pelo HIV podem abrigar cepas distintas daquelas presentes

no plasma seminal, sendo, portanto, considerados diferentes reservatórios do HIV (PARANJPE et al., 2002).

O plasma seminal pode conter sangue visível ou detectável através de exames. Tal patologia é denominada de hemospermia e é definida pela presença de sangue no ejaculado, devido a doenças testiculares, no epidídimo, ducto deferente, vesícula seminal, glândulas bulbo-uretrais, próstata, bexiga ou uretra. Sua incidência não é bem estabelecida e se estima que represente 1% das queixas urológicas (WROCLAWSKI, 2010).

Os espermatozóides não são infectados pelo HIV, entretanto, permitem a fixação do HIV através de um receptor de superfície denominado GalAAG que apresenta forte afinidade à proteína gp 120 do HIV (BROGI et al., 1996).

O plasma seminal é um importante meio de transmissão viral à mucosa feminina, pois contém aminas básicas que protegem os vírions do meio ácido do trato genital feminino, além de apresentar outros fatores que podem aumentar a eficácia da transmissão do HIV (STOIBER et al., 2005). Como exemplo a esses fatores pode-se destacar a estimulação da secreção da CCL20 pelas células epiteliais da mucosa vaginal que estiveram em contato com o plasma seminal (BERLIER et al., 2006).

A CCL20 é uma quimiocina capaz de promover a migração de células de Langerhans que possuem a capacidade de transportar o HIV através da mucosa intacta. Portanto, quanto maior a concentração de CCL20 em um meio, maior será a agregação de células de Langerhans que facilitarão a travessia desse vírus pela mucosa. A CCL20 é secretada por um grande número de células epiteliais, como as da pele, da mucosa oral e da mucosa vaginal (BERLIER et al., 2006).

Trabalho realizado por Münch et al. (2007), mostra que o plasma seminal possui potente papel pró-inflamatório na mucosa cérvico-vaginal durante a infecção por HIV-1. Em estudo realizado pelo *Groupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes, Faculté de Médecine Jacques Lisfranc, Saint-Etienne, France* (GIMAP) revelou-se que um componente do plasma seminal, ainda em curso de identificação, foi capaz de induzir a produção de CCL20 em células epiteliais vaginais (SiHa) induzindo assim o recrutamento de células dendríticas que poderiam reconhecer o HIV presente no sêmen (BERLIER et al., 2006).

Na sequência do estudo anterior, o GIMAP tentou caracterizar fatores presentes no plasma seminal que ativam a produção de CCL20 pelas células epiteliais. Para isso, células epiteliais vaginais humanas (linha celular SiHa) foram incubadas por 24 horas, na presença de Lf purificada ou seqüências de peptídeos da Lf correspondentes aos produtos de degradação desta proteína. Os resultados mostraram que a molécula completa de Lf não estimula a

produção de CCL20 pelas células epiteliais vaginais, mas um de seus sete peptídeos de degradação, denominado de G-12-I, estimulou significativamente esta produção a qual foi dose-dependente.

A Lf é uma glicoproteína de 80 kDa de papel fundamental não apenas contra microorganismos, mas também contra respostas imunitárias excessivas prejudiciais ao hospedeiro (ACTOR; HWANG; KRUZEL, 2009). Isolada em 1960, a Lf ainda não teve sua função totalmente esclarecida pela ciência (PIERCE; LEGRAND; MAZURIER, 2009).

A Lf é uma proteína pertencente à família das transferrinas, capaz de fixar irreversivelmente dois íons férricos. A fixação do ferro é estável em diferentes pH, sendo necessário um pH inferior à dois para que ocorra sua dissociação. Essa característica faz da Lf uma importante proteína queladora de ferro (PIERCE; LEGRAND; MAZURIER, 2009).

Sintetizada pelos epitélios glandulares a Lf está presente no leite, lágrimas, bile, saliva, secreções genitais, secreções do trato respiratório e gastrointestinal, podendo também ser sintetizada e armazenada pelos neutrófilos polinucleares (GONZÁLEZ-CHÁVEZ, ARÉVALO-GALLEGOS, RASCÓN-CRUZ, 2009). A concentração sérica da Lf é baixa, no entanto, pode aumentar pela degranulação dos neutrófilos que elevam a concentração da Lf no sítio de inflamação (ACTOR; HWANG; KRUZEL, 2009). A Lf é considerada como primeira linha de defesa contra várias infecções microbianas podendo ser bactericida ou bacteriostática devido ao seqüestro de ferro no local da inflamação. Outros efeitos diretos da Lf incluem atividade anti-viral, anti-parasitários e antifúngicos (ACTOR; HWANG; KRUZEL, 2009). A Lf também possui atividade indireta, na prevenção de invasão do patógeno, bloqueando sua interação com os receptores utilizados para a entrada na célula hospedeira (OCHOA; NOGUERA-OBENZA; CLEARY, 2004).

A Lf é capaz de modular o sistema imune adaptativo promovendo a maturação dos precursores das células T helper e de células B (ZIMECKI et al., 1991). Em relação ao HIV, a Lf é capaz de modular sua infecção nas mucosas desempenhando um papel importante na imunidade inespecífica. No entanto, peptídeos resultantes de clivagem da Lf pelas enzimas do tipo elastase e proteinase apresentam características pró-inflamatórias aumentando a concentração de células alvo do HIV em mucosas. Em 2005, Komine et al. verificaram altas concentrações de produtos de clivagem da Lf em secreções mamárias bovinas que apresentavam mastite, infecção de uma ou mais glândulas mamárias causada por diferentes tipos de bactérias. Em 2007, Komine et al. verificaram altas concentrações de produtos de clivagem de Lf em saliva provenientes da glândula parótida de pacientes que apresentavam periodontite.

Como já visto, dentre as substâncias que podem modular a infecção pelo HIV nas mucosas está a Lf, que desempenha um papel importante na imunidade inespecífica e tem um efeito inibidor na infecção desse vírus. Curiosamente, os peptídeos resultantes da clivagem da Lf apresentam características pró-inflamatórias aumentando a concentração de células alvo do HIV. Assim, torna-se importante pesquisar a presença e a concentração dessas substâncias em fluidos corpóreos que possam entrar em contato com o epitélio endocervical (plasma seminal, conteúdo vaginal e saliva). Pretendem-se com este estudo detectar possíveis diferenças na concentração da Lf e dos seus produtos de clivagem nos fluidos corpóreos citados, relacionando-os à sua capacidade de estimular a produção de CCL20 pelas células epiteliais endocervicais, já que a CCL20 está relacionada ao aumento do número de células de Langerhans, que é uma célula alvo, relacionada à entrada do HIV pelas mucosas. Eventuais diferenças de concentração de Lf e produtos de degradação poderão ser responsáveis por diferentes estímulos na produção de CCL20 pelas células do epitélio endocervical.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais:

- Estudar a produção de CCL20 por cultura de células HEC-1A estimuladas com plasma seminal, saliva e conteúdo vaginal.

2.2 Objetivos específicos:

A produção de CCL20 pelas células HEC-1A estimuladas serão correlacionadas aos seguintes fatores do plasma seminal, saliva e conteúdo vaginal:

- De acordo com a soropositividade para o HIV;
- Dosagem de Lf e de proteína total no plasma seminal, na saliva e no conteúdo vaginal;
- Carga viral do plasma seminal;
- Produtos de clivagem da lactoferrina presentes no plasma seminal e na saliva;
- e,
- Condição periodontal dos participantes e capacidade da saliva de estimular a produção de CCL20 pelas células HEC-1A.

3 POPULAÇÃO, MATERIAL E MÉTODO

3.1 Casuística

Para a realização desse estudo foram selecionados participantes soropositivos e soronegativos para o HIV de três diferentes centros de atendimento do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRPUSP) abaixo descritos. O HC- FMRPUSP é um hospital universitário de grande porte, integrado ao Sistema Único de Saúde (SUS), situado em Ribeirão Preto, cidade da região nordeste do estado de São Paulo, a 320 km da capital. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo comitê de ética do HC-FMRPUSP, processo 1610/2009 (Anexo A).

- Unidade Especial de Tratamento de Doenças Infecciosas (UETDI): A UETDI é uma unidade especializada no atendimento de indivíduos acometidos pelo HIV/aids. A UETDI possui atendimento ambulatorial e internação de pacientes infectados pelo HIV, em um trabalho multidisciplinar do qual participam médicos, profissionais de enfermagem, nutricionistas, psicólogos, assistentes sociais e dentistas. Nessa unidade selecionaram-se participantes do sexo masculino infectados pelo HIV que estavam em seguimento e participantes do sexo masculino não infectados pelo HIV, que acompanhavam os pacientes em seguimento.
- Ambulatório de Moléstias Infecto-Contagiosas em Ginecologia (AMIG): Ambulatório do HC-FMRPUSP especializado em tratamento ginecológico terciário de pacientes com alguma moléstia infecto-contagiosa, dentre as quais se destacam o atendimento à pacientes infectadas pelo HIV. Nesse ambulatório foram selecionadas mulheres soropositivas para o HIV.
- Ambulatório de Ginecologia da Unidade Básica de Saúde da Vila Lobato: A Unidade Básica de Saúde da Vila Lobato, pertencente ao HC-FMRPUSP, é uma unidade básica de saúde onde mulheres sem complicações sistêmicas recebem atendimento ginecológico rotineiro. Nesse ambulatório foram selecionadas pacientes as soronegativas para o HIV.

Os potenciais participantes foram abordados durante atendimento médico nos diferentes locais do HC-FMRPUSP e convidados a participarem do estudo. Aqueles que concordaram, foram informados sobre os objetivos da pesquisa e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Os participantes soropositivos e soronegativos para o HIV

assinaram diferentes termos de consentimento conforme recomendado pelo comitê de ética do HC-FMRPUSP (Anexo B: participantes soronegativos para o HIV; e, Anexo C: participantes soropositivos para o HIV).

A seleção dos participantes baseou-se nos seguintes critérios de inclusão e exclusão:

- Ter idade superior ou igual a 18 anos;
- Aceitar a participação no projeto e assinar o termo de consentimento livre e esclarecido;
- Ser portadora do HIV, com infecção confirmada laboratorialmente por ELISA para detecção de anticorpos contra o vírus, reagentes em amostras sanguíneas distintas, assim como a realização de um exame confirmatório (Western blot); ou apresentar soronegatividade para HIV comprovada por testagem realizada em no máximo seis meses antes, ou após a coleta das amostras biológicas;
- Possuir mais de 19 dentes e não ter realizado nenhum tratamento periodontal, terapia antibiótica, ou uso regular de medicações anti-inflamatórias nos três meses que antecederam o exame. Tais cuidados foram tomados, pois a terapia antibiótica e o uso de anti-inflamatórios de forma regular podem camuflar a condição periodontal e influenciar o examinador a uma interpretação errônea (RAMSEIER et al., 2009);
- Não estarem em tratamento radioterápico ou quimioterápico;
- Os pacientes do sexo masculino sem infecção genital ou doença sexualmente transmissível; e,
- As participantes do sexo feminino passaram por exames ginecológicos e apenas as participantes que não apresentavam infecções genitais foram selecionadas.

3.2 Avaliação clínica dos participantes

A avaliação e coleta de materiais biológicos dos participantes foram realizadas em três etapas distintas, conduzidas no mesmo dia: 1. Anamnese (Anexo D); 2. Exame clínico oral e perioral; e, 3. Coletas dos materiais biológicos a serem estudados.

3.2.1 Anamnese

Os participantes foram submetidos a um questionário contendo 26 perguntas sobre suas condições médico-odontológicas (Anexo D). Algumas questões foram dirigidas diretamente ao entrevistado, como: dados pessoais, automedicação e a história odontológica. Informações sobre tempo de soropositividade para o HIV, tempo de tratamento, ganho ou perda recente de peso, medicamentos em uso, contagem de LTCD4⁺, carga viral, classificação da infecção pelo HIV (CDC, 1993) e histórico ou presença de manifestações de infecções oportunistas, foram obtidas após consulta ao prontuário médico.

3.2.2 Exame clínico

Para o exame clínico, foram utilizados todos os equipamentos necessários à proteção individual (EPI), assim como o uso de espátula de madeira e gaze para a movimentação de mucosas e língua durante o exame intraoral. O exame clínico teve início pela palpação dos linfonodos em região de cabeça e pescoço atentando para possíveis alterações de volume, consistência e temperatura. No exame da região peribucal foram avaliados alterações junto à cavidade bucal: comissuras labiais, lábios, nariz, bochecha e região mentoniana. No exame intrabucal foram avaliados sistematicamente língua, assoalho bucal, gengiva, mucosa jugal, palato duro, palato mole, tonsilas, e amídalas e eventual deficiência na produção salivar. As manifestações orais observadas foram catalogadas segundo o preconizado por *EC-Clearinghouse on Oral Problems Related to HIV Infection and WHO Collaborating Centre on Oral Manifestations of the Immunodeficiency Virus, 1993*. Após exame clínico da mucosa bucal o participante era convidado a realizar a coleta de saliva (descrito no item 3.3.1). Após esse procedimento o paciente foi submetido ao exame periodontal.

3.2.3 Exame periodontal

O exame periodontal foi realizado após a coleta de saliva, para que possíveis sangramentos gengivais provocados por esse exame não interferissem na qualidade das amostras salivares coletadas.

Para o exame periodontal foram utilizadas sondas periodontais milimetradas. Todos os dentes presentes (exceto os terceiros molares) foram sondados em seis sítios: sítio mesio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mesio-lingual/palatino, lingual/palatino, disto lingual/palatino.

De cada sítio realizou-se três diferentes mensurações, segundo preconizado por Ramseier et al. (2009):

- Profundidade de sondagem: Distância entre a margem gengival e o fundo de bolsa. Para essa mensuração a sonda periodontal foi introduzida entre o dente e a gengiva paralelamente ao longo eixo do dente, respeitando-se o contorno dental. Todas as profundidades de bolsa superiores a quatro milímetros foram anotadas;
- Perda de inserção clínica: Distância entre o fundo de bolsa e a junção amelo-dentinária. Para essa mensuração a sonda também foi introduzida paralelamente ao longo eixo do dente, respeitando-se o contorno dental. Foram anotadas todas as perdas de inserção clínica superiores a três milímetros; e,
- Sangramento à sondagem: Foram anotados todos os sítios sangrantes após a sondagem.

Os participantes foram classificados em relação à sua condição periodontal em saudáveis, com gengivite ou com periodontite, seguindo os critérios preconizados por Ramseier et al. (2009):

Periodonto saudável:

- Nenhum sinal clínico de doença periodontal;
- Nenhuma profundidade de sondagem maior que quatro milímetros;
- Nenhuma perda de inserção clínica superior a três milímetros; e,
- Sangramento à sondagem inferior a 20% dos sítios examinados.

Gengivite:

- Nenhum sinal clínico de doença periodontal;
- Nenhuma profundidade de sondagem superior a quatro milímetros;
- Nenhuma perda de inserção clínica superior a três milímetros; e,
- Sangramento à sondagem em mais de 20% dos sítios examinados.

Periodontite:

No mínimo quatro sítios com:

- Perda de inserção clínica maior que três milímetros; e,
- Profundidade de sondagem maior que quatro milímetros.

3.3 Coleta dos fluidos corpóreos

Foram coletados de cada participante: sangue (dez mililitros), saliva total não estimulada (cinco mililitros) e secreções genitais (conteúdo vaginal ou líquido seminal).

3.3.1 Coleta da saliva

A coleta da saliva foi realizada pelo pesquisador principal, para tanto, os participantes foram instruídos a não se alimentar, não beber, não fumar e não escovar os dentes uma hora antes da coleta, de forma a minimizar os riscos de contaminação da amostra.

Os participantes foram orientados a ficarem sentados, com a cabeça levemente inclinada para frente, e deixarem salivar normalmente por cinco minutos, em um frasco colocado abaixo do lábio inferior. Todas as amostras foram coletadas preferencialmente, entre oito e dez horas da manhã (NAVAZESH, 1993).

As amostras foram levadas ao laboratório e centrifugadas à 800g (aceleração da gravidade) por 30 minutos a 4 graus Celsius (°C). O plasma salivar foi alicotado em criotubos e imediatamente congelado à -80°C até as análises necessárias, as quais não excederam seis meses (SCHENKELS; VEERMAN; AMERONGEN, 1995).

3.3.2 Coleta de sangue

A coleta de sangue foi realizada por profissionais especializados do HC-FMRPUSP. Foram coletados dez mililitros de sangue em *vacuteiner* contendo ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA). O plasma sanguíneo foi obtido por centrifugação do sangue total (800g por 10 min), alicotado em criotubos e estocados à -80°C , por período máximo de seis meses, até o seu processamento.

3.3.3 Coleta do conteúdo vaginal

Amostras dos conteúdos vaginais foram coletadas, por profissionais ginecologistas do HCFMRP, através de escova para citologia. A escova para citologia foi introduzida na vagina e girada uma vez no fundo de saco vaginal. A seguir, a escova foi colocada em um tubo *eppendorf*^R de 0,5 mililitros (ml) contendo 0,3ml de solução salina. Após quebrar a haste da escova citológica, o tubo foi fechado e agitado em vortex por um minuto, invertido e realizado um orifício na parte inferior. Com cuidado, o mesmo foi encaixado em outro tubo *eppendorf*^R de 1,5ml e submetido à centrifugação por cinco minutos à 300g. Após a centrifugação, o tubo de cima foi descartado e finalmente o volume acertado para 500 microlitros (μl) com solução salina e estocado, por até seis meses, à -80°C para posteriores dosagens.

3.3.4 Coleta do plasma seminal

A coleta do líquido seminal foi realizada pelo próprio participante, que para tanto foi orientado a realizar uma coleta asséptica, por masturbação em um coletor universal, sem o uso de lubrificantes ou água.

O material coletado foi processado em até quatro horas após a ejaculação. O plasma seminal foi obtido após centrifugação (800g durante 30 minutos), alicotados e estocado a -80°C por um período máximo de seis meses até seu processamento.

3.4 Cultura de células do epitélio monoestratificado endocervical (HEC-1A)

Para o cultivo celular do epitélio monoestratificado endocervical utilizou-se a linhagem de células HEC-1A (*ATCC-LGC Standards, Molsheim, France*). Todos os procedimentos do cultivo foram realizados em capela de fluxo laminar seguindo criteriosamente os protocolos para a manutenção da esterilidade dos materiais, suplementos e meio de cultura. As células foram armazenadas em nitrogênio líquido à -180°C até sua utilização.

Para o cultivo, as células HEC-1A foram descongeladas em banho-maria (37°C), plaqueadas em meio de cultura em frascos de 25 centímetros quadrados (cm²) e mantidas em incubadoras (*Precision Scientific, Pondicherry, India*), à temperatura controlada de 37°C, em ambiente umidificado contendo 5% de gás carbônico (CO₂). O crescimento celular foi monitorado com microscópio invertido de fase (*Nikon, Tokyo, Japan*).

Para a tripsinização retirou-se o meio de cultura do frasco e lavou-se com cinco mililitros de tampão fosfato-salino (PBS). Após a lavagem, adicionou-se sete mililitros de tripsina deixando-a incubar à 37°C por 15 minutos até o descolamento das células da parede do frasco. Adicionou-se 20 ml de meio de cultura *Dulbecco's Minimal Essential Medium Cambrex BioScience, Verviers, Belgium* (DMEM-F12) e recuperou-se o conteúdo do frasco em tubo de ensaio centrifugado a 1300 rotações por minuto (RPM) durante cinco minutos. Após descarte do sobrenadante o precipitado celular foi ressuspensionado em dez mililitros de DMEM-F12 e colocado novamente em frascos contendo 20 ml de DMEM-F12 e um mililitro da cultura celular obtida. Reincubou-se em 5% de CO₂ à 37°C. O meio de cultura foi trocado a cada dois dias e nova tripsinização era realizada quando se atingia a confluência das células (de três a quatro dias).

3.5 Estimulação das células do epitélio monoestratificado endocervical (HEC-1A).

As células HEC-1A foram incubadas, como descrito anteriormente, em placa de 96 poços, com a linhagem celular ocupando 70% da superfície total do poço.

As células foram então estimuladas com as 56 amostras de saliva dos participantes, em duplicata. Para tanto, diluiu-se a saliva dez vezes em meio de cultura (DMEM-F12).

Em cada procedimento acrescentou-se controles negativos (amostra não tratada, grupo controle) que consistiam na estimulação das células HEC-1A apenas com meio de cultura DMEM/F12, sem a adição de qualquer amostra.

Também em cada placa acrescentou-se controles positivos, que consistiam em meio de cultura DMEM-F12 adicionado a IL-1 β na concentração de 25ng/ml. A IL-1 β foi selecionada como controle positivo por ser uma citocina ativadora da secreção de CCL20 pelas células HEC-1A (CREMEL et al., 2005). As placas com 96 poços contendo as células HEC-1A estimuladas com saliva, controles negativos e controles positivos foram incubadas *overnight* em temperatura úmida de 37°C à 5% de CO₂.

O mesmo método foi aplicado para a estimulação da cultura de células HEC-1A pelo plasma seminal e pelo conteúdo vaginal. Para o estudo do plasma seminal utilizou-se 32 amostras dos participantes e para o estudo do conteúdo vaginal foram usadas 26 amostras.

3.6 Dosagem de CCL20 por teste imunoenzimático (ELISA)

Após a incubação *overnight* da cultura celular do epitélio monoestratificado endocervical com as amostras a serem estudadas (saliva, plasma seminal e conteúdo vaginal e controles positivos e negativos), retirou-se 100 μ l do sobrenadante de cada poço e dispensou-se em uma placa com 96 poços, onde realizou-se a dosagem de CCL20 por ELISA.

Para a mensuração da produção de CCL20 por ELISA, usou-se *Kit Human MIP-3alpha*, RayBio, Norcross, USA, conforme as recomendações do fabricante.

A dosagem de CCL20 foi realizada diretamente sobre cinco amostras de plasma salivar, cinco amostras de plasma seminal e em todas as 23 amostras de secreção vaginal. Para tal, todas as amostras foram diluídas dez vezes em PBS e distribuídas 100 μ l por poço, em duplicata. O mesmo Kit foi empregado para a dosagem de CCL20 (*Human MIP-3alpha* – RayBio, Norcross, USA), seguindo-se as recomendações do fabricante.

Para facilitar a apresentação dos dados, padronizou-se que a produção de CCL20 pelas células HEC-1A estimuladas pela saliva, plasma seminal ou conteúdo vaginal, seriam descritas levando em conta o número de vezes que essas células produziram CCL20 em relação às células não tratadas (grupo controle).

3.7 Dosagem da Lf por ELISA

A dosagem da Lf nas amostras biológicas dos participantes (saliva, plasma seminal e conteúdo vaginal) foi determinada por ELISA utilizando-se o seguinte método: Inicialmente realizaram-se diluições seriadas de Lf (*Lactoferrin from human Milk – Sigma-Aldrich, St. Louis, USA*), em concentração inicial de 5µg/ml. Adicionou-se 100µl de cada concentração de Lf por poço, em duplicata. Saliva, secreção vaginal e plasma seminal foram diluídos dez vezes em PBS e adicionadas à placa de ELISA, em duplicata (100 µl por poço). As diferentes concentrações de Lf e as amostras dispensadas sobre a placa foram incubadas durante uma hora em banho-maria à 37°C. Após a incubação e posterior lavagem com PBS realizou-se o bloqueio da placa com ovalbumina a 10%, (*Albumin from Chicken Egg Whites Grade II, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA*). Empregando-se 200µl por poço, *overnight*, à 4°C. Após o bloqueio, adicionou-se o anticorpo primário policlonal de coelho anti-lactoferrina humana (*Rabbit anti-human lactoferrin – Sigma-Aldrich, St. Louis, USA*) incubado durante uma hora, em banho-maria à 37°C. Após lavagens com PBS, adicionou-se o anticorpo secundário oriundo de ovelha anti-IgG de coelho conjugada à peroxidase (*CAPPEL – Peroxidase conjugated goat IgG fraction to rabbit IgG – MP Biomedicals, Illkirch, France*). Incubou-se 45 minutos, e ,após nova lavagem com PBS, realizou-se a revelação com *o-Phenylenediamine dihydrochloride* (*Sigma-Aldrich, St. Louis, USA*), segundo as recomendações do fabricante. Para a leitura empregou-se absorbância, realizada em leitor de ELISA (*Diatech, Dhaka Bangladesh*), à 492nm.

3.8 Dosagem de proteínas totais

Para a dosagem protéica utilizou-se a técnica de Bradford (MOHAMMEDI et al., 1989) em placa de ELISA com 96 poços.

Realizou-se uma diluição seriada com albumina de soro bovino (BSA), em concentração inicial de 80µg/ml. Adicionou-se 150 µl de cada concentração de BSA por poço, em duplicata, a fim de obter-se o padrão para a dosagem das proteínas totais das amostras estudadas (saliva, plasma seminal, e conteúdo vaginal). As amostras foram diluídas 75 vezes em PBS. Adicionou-se 150 µl de cada diluição das amostras por poço, em duplicata. Após a

adição das amostras e do padrão de BSA, adicionou-se 150µl de azul de Comassie (*Sigma-Aldrich, St. Louis, USA*). Após este procedimento a placa foi lida, em leitor de ELISA (*Diatech, Dhaka Bangladesh*), à absorbância de 590 nm.

3.9 Carga viral

A quantificação do RNA do HIV (carga viral) no plasma seminal foi realizada pelo teste HIV-Monitor (*Roche Diagnostic Systems, Branchburg, USA*). O RNA foi extraído das amostras através de um protocolo modificado à base de sílica (*kit QIAmp RNA viral; Qiagen, Chatsworth, EUA*), e a reação em cadeia da polimerase foi realizada utilizando o kit HIV Monitor (*Roche Diagnostic Systems, Branchburg, USA*).

3.10 Western blot

Após a dosagem protéica das amostras biológicas calculou-se o volume de amostra que contivesse cinco microgramas (µg) de proteína. Essa amostra foi diluída em PBS a fim de obtermos dez microlitros de volume final. Ao volume final, adicionou-se 10 µl de tampão de carga LSB (*Sigma-Aldrich, St. Louis, USA*). Aqueceu-se o volume final à 100°C por cinco minutos, afim de obter-se eficiente desnaturação das proteínas.

Vinte microlitros de cada amostra foram submetidas à eletroforese (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis - SDS-PAGE*). A primeira etapa da eletroforese (eletroforese em gel de empilhamento) foi realizada submetendo o gel a uma voltagem de 60 volts durante 20 minutos, enquanto que a segunda etapa da eletroforese (eletroforese em gel de separação) foi conduzida submetendo o gel a voltagem de 180 volts por 50 minutos. O padrão de peso molecular utilizado foi o *Kaleidoscope Prestained Standards* (*BioRad, Hercules, USA*).

Para confecção dos géis de separação e de empilhamento empregou-se os materiais descritos na tabela 3.

Tabela 3: Solução de preparo do gel de separação e empilhamento, para eletroforese em gel de poliacrilamida, SDS PAGE

	Gel de separação (10%)	Gel de empilhamento (4%)
Água destilada	6,5 ml	5,8 ml
Tris-HCl 1,5M pH 8,8	4 ml	
Tris-HCl 0,5M pH 6,8		2,5 ml
SDS 10%	160 µl	100 µl
Acrilamida 30%	5,4 ml	1,35 ml
PSA 10%	150 µl	100 µl
TEMED	15 µl	10 µl

‰: porcentagem.

ml: mililitro.

µl: microlitro.

pH: Potencial Hidrogeniônico.

Tris-HCL: Tris hidrocloreto.

M: Molar.

SDS: Dodecil Sulfato de Sódio.

PSA: Persulfato de amônio.

TEMED: Tetrametiletilenodiamina.

As proteínas que migraram no gel de separação foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose através de eletrotransferência (*Amersham Biosciences mini VE, Piscataway, USA*), empregando-se 60 volts durante 1 hora e 40 minutos. Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi bloqueada com tampão de saturação (tampão de leite em pó a 5%) *overnight* à 4°C sob agitação.

Adicionou-se o anticorpo primário diluído em tampão de leite (*Rabbit anti-human lactoferrin - Sigma-Aldrich, St. Louis, USA*) ou anticorpo IgG de coelho anti-peptídeo G-12-I) por 2 horas, à temperatura ambiente, sob agitação.

Após o descarte da solução contendo o anticorpo primário, realizou-se lavagem com PBS à temperatura ambiente, sob agitação.

Após a lavagem com PBS, o anticorpo secundário (*CAPPEL: Anti-Rabbit Peroxidase Conjugated Goat IgG Fraction to Rabbit – IgG - MP Biomedicals, Illkirch, France*) foi diluído em solução de bloqueio e aplicado a membrana de nitrocelulose durante uma hora, à temperatura ambiente, sob agitação. Procedeu-se a seguir, nova lavagem com PBS.

A detecção colorimétrica e revelação foram realizadas através de Kit de quimioluminescência (*BioRad, Hercules, USA*) e fotografadas em visualizador de géis (*Molecular Imager ChemiDoc XRS System, BioRad, Hercules, USA*).

Para o estudo das amostras de plasma seminal utilizou-se as três amostras que mais estimularam a produção de CCL20 pelas células HEC-1A e as três amostras que menos estimularam a produção de CCL20. Cada amostra foi colocada em uma coluna do gel de

Western blot em ordem decrescente de estimulação. Duas membranas idênticas foram confeccionadas. Na primeira membrana evidenciou-se a presença de Lf utilizando anticorpo anti-Lf (*Rabbit anti-human lactoferrin, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA*) e na segunda membrana evidenciou-se a presença do peptídeo de clivagem da lactoferrina G-12-I, utilizando anticorpo anti-peptídeo G-12-I, obtido através de soro sanguíneo de coelho imunizado com o peptídeo G-12-I e purificado por cromatografia de afinidade.

Utilizou-se método idêntico para o estudo do plasma salivar.

3.11 Cromatografia por afinidade do plasma seminal

O fracionamento protéico de um *pool* de 12 amostras de plasma seminal de participantes soronegativos para o HIV foi realizado por cromatografia por afinidade. A cromatografia por afinidade tem por objetivo separar as proteínas por afinidade eletrostática e é baseada na ligação das moléculas carregadas da amostra com grupos de moléculas carregadas da matriz insolúvel da coluna. A ligação entre as proteínas das amostras e as moléculas da matriz da coluna é reversível e sua estabilidade depende do pH da coluna.

Um *pool* de 12 amostras dos participantes soronegativos para o HIV foi diluído em água deionizada (10 vezes) para obtenção de concentração equivalente à 50mM de cloreto de sódio (NaCl). O plasma seminal diluído foi filtrado em uma coluna de afinidade (*Hitrap Q FF; GE Healthcare, Amersham Biosciences, Piscataway, USA*) com capacidade para um mililitro de amostra, sendo que tal processo de filtração foi realizado em velocidade de um mililitro por minuto. Um total de 50 ml de plasma seminal diluído dez vezes foi filtrado, e o plasma seminal não retido pela coluna foi descartado. A coluna de cromatografia saturada com proteínas do plasma seminal foi então lavada com 20 ml de PBS diluído três vezes em água destilada para a eliminação completa das proteínas não retidas na coluna.

Para o processo de reversão da ligação entre as proteínas do plasma seminal e a matriz da coluna utilizou-se tampão fosfato, NaCl 50 mM, pH 7,4 (tampão A) e tampão fosfato, NaCl 500 mM, pH 7,4 (tampão B). Seis diferentes misturas de tampão A e B foram utilizadas, a fim de reverter a ligação entre as proteínas da amostra e as moléculas da coluna e assim separar as moléculas mais carregadas das menos carregadas eletricamente. Foram elas: 1ª. concentração: 95% de tampão A e 5% de tampão B; 2ª. concentração: 90% de tampão A e 10% de tampão B, 3ª. concentração: 80% de tampão A e 20% de tampão B, 4ª. concentração:

70% de tampão A e 30% de tampão B, 5^a. concentração: 60% de tampão A e 40% de tampão B; 6^a. concentração: 50% de tampão A e 50% de tampão B. As concentrações dos tampões foram aumentadas quando nenhuma proteína mais era liberada da coluna e a concentração de proteína estabilizada próximo a zero. As amostras fracionadas foram captadas em diferentes tubos de ensaio a cada 0,5 ml de solução despendida, sendo obtidas 28 frações do plasma seminal, nas quais se mensurou a concentração de Lf e de proteína total seguindo o protocolo descrito anteriormente.

A cultura de células HEC-1A foi estimulada com as diferentes frações do plasma seminal, utilizando-se como controle negativo a mistura de tampão A e tampão B correspondente a cada fração, diluída dez vezes em meio de cultura DMEM-F12. A produção de CCL20 pelas células HEC-1A foi mensurada no sobrenadante por ELISA, como descrito anteriormente.

A produção de CCL20 pelas células HEC-1A, estimulada com as diferentes frações de plasma seminal, estão descritas em número de vezes que a fração estimulou a produção de CCL20 em relação ao seu controle negativo.

3.12 Análise estatística

Para a análise estatística utilizou-se o software GraphPad Prism 5.00 para Windows (1992-2007 GraphPad Software, Inc, San Diego, USA).

Os resultados foram apresentados como média, seguido de seu desvio padrão.

Após realização de teste de normalidade, concluiu-se que os resultados eram compostos de dados não paramétricos e, portanto, utilizou-se a comparação de duas médias utilizando o teste de Mann-Withney. Para a comparação de três médias utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis. Para as análises de correlações entre duas variáveis empregou-se correlação não paramétrica de Spearman. (PAGANO; GAUVREAU, 2004)

Consideraram-se para as análises, intervalos de confiança de 95% e valores de *p* significantes quando iguais ou inferiores a 0,05.

4 RESULTADOS

Dividiu-se o trabalho em três diferentes estudos a fim de facilitar-se a compreensão dos resultados.

4.1 Resultados referentes ao estudo do plasma seminal

4.1.1 Características gerais dos participantes.

Para esse estudo foi utilizado 34 amostras de plasma seminal, das quais 22 eram provenientes de participantes soropositivos e 12 participantes soronegativos para o HIV.

Os participantes soropositivos apresentavam em média $38,1 \pm 6,5$ anos de idade e os participantes soronegativos para o HIV apresentavam em média $35,4 \pm 7,7$ anos. Dentre os 22 participantes soropositivos para o HIV, 17 faziam uso de terapia antirretroviral altamente potente (*Highly Active Antiretroviral Therapy* - HAART) e apenas cinco não faziam uso. Nenhum relatou presença de lesões genitais durante a anamnese.

4.1.2 Estudo da produção de CCL20 por cultura de células HEC-1A estimuladas com plasma seminal de participantes soronegativos para o HIV.

No sobrenadante das células HEC-1A incubadas com meio de cultura DMEM-F12 (controle negativo) ou com IL-1 β (25ng/ml) (controle positivo) ou com plasma seminal (diluído 1:10 em DMEM-F12) foram mensuradas a secreção de CCL20 por ELISA.

O sobrenadante das células HEC-1A que foram tratadas apenas com meio de cultura (grupo controle) apresentaram concentração de 72 ± 28 picogramas por mililitro (pg/ml) de CCL20. A concentração de CCL20 esteve aumentada entre as células HEC-1A estimuladas com IL-1 β (controle positivo) e com amostras de plasmas seminais. As células tratadas com IL-1 β apresentavam concentração média de CCL20 de 750 ± 88 pg/ml (total de quatro experimentos) ($p = 0.0286$), enquanto em sobrenadante das células HEC-1A estimuladas com 12 plasmas seminais soronegativos para o HIV a concentração média de CCL20 foi de 459 ± 91 pg/ml de CCL20 ($p = 0.0011$), conforme figura 4.

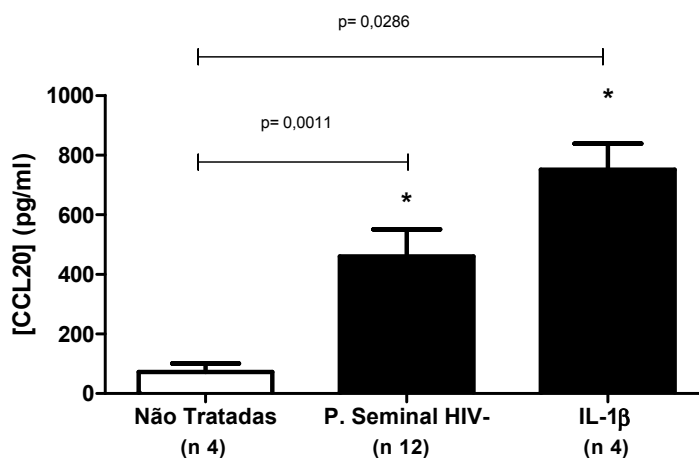


Figura 4: Produção de CCL20 pelas células HEC-1A estimuladas com meio de cultura DMEM-F12 (controle negativo), com plasma seminal de participantes soronegativos para o HIV (grupo de estudo) ($p = 0.0011$) e IL-1 β (controle positivo) ($p = 0.0286$).

* Diferença de produção de CCL20 pelas células HEC-1A estatisticamente significativa em relação às células não tratadas (teste Mann Whitney).

CCL20: *Quimiocin C-C motif ligand 20*.

pg/ml: Picogramas por mililitros.

P. Seminal HIV- : Plasma seminal de participantes soronegativos para o HIV.

IL-1 β : Inteleucina 1 beta.

n: Número de experimentos.

HEC-1A: Células epiteliais monoestratificadas endocervicais.

4.1.3 Estudo da produção de CCL20 pelas células HEC-1A estimuladas com plasma seminal de participantes soropositivos e soronegativos para o HIV.

Os participantes foram divididos em dois grupos: participantes soronegativos para o HIV (12 amostras), participantes soropositivos para o HIV (23 amostras). Culturas de células HEC-1A foram estimuladas com os plasmas seminais dos grupos dos participantes soronegativos e soropositivos para o HIV.

A fim de facilitar a apresentação dos resultados, a produção de CCL20 foi descrita levando-se em conta o número de vezes que as células HEC-1A estimuladas com amostras de plasma seminal secretaram CCL20 em relação às células estimuladas apenas com o meio de cultura (grupo controle).

Os plasmas seminais dos participantes soronegativos e soropositivos para o HIV foram capazes de estimular a produção de CCL20 pelas células HEC-1A quando comparados às células estimuladas apenas com o meio de cultura ($p < 0,0001$). No entanto, observou-se que o plasma seminal de pacientes soropositivos para o HIV foi responsável por um maior estímulo

na secreção de CCL20 pelas células HEC-1A quando comparado ao plasma seminal dos participantes soronegativos ($p=0,022$). O plasma seminal de participantes soronegativos para o HIV aumentou a produção de CCL20 em $5,38 \pm 0,91$ vezes em relação ao grupo controle, enquanto o plasma seminal dos participantes soropositivos aumentou a produção de CCL20 em $7,57 \pm 3,26$ vezes ($p=0,022$), conforme figura 5.

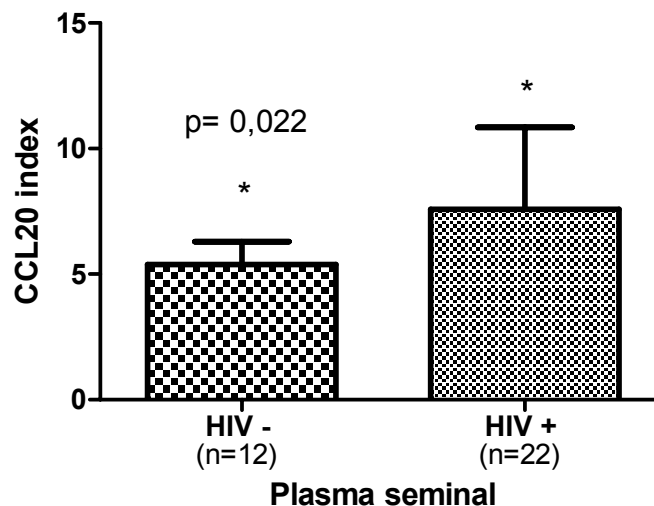


Figura 5: Resultados da estimulação da produção de CCL20 pelas células HEC-1A tratadas com plasma seminal de participantes soronegativos ($n=12$) e soropositivos ($n=22$) para o HIV ($p=0,022$).

* Diferença de produção de CCL20 estatisticamente significativa (teste Mann Whitney).

CCL20: *Quimiocin C-C motif ligand 20*.

CCL20 index: Número de vezes que o plasma seminal estimulou a produção de CCL20 em relação às células não tratadas (grupo controle).

HIV-: Plasma seminal de participantes soronegativos para o HIV.

HIV+: Plasma seminal de participantes soropositivos para o HIV.

n: Número de experimentos.

4.1.4 Concentração de proteína total e de lactoferrina no plasma seminal de participantes soronegativos e soropositivos para o HIV.

As concentrações de proteína total e de Lf nos plasmas seminais estão representadas em microgramas por mililitro de plasma seminal ($\mu\text{g/ml}$).

Mais uma vez para esse estudo dividiu-se as 34 amostras de plasma seminal em dois diferentes grupos: participantes soronegativos para o HIV ($n=12$) e participantes soropositivos para o HIV ($n=22$).

Os participantes soropositivos para o HIV apresentaram concentração de proteína total reduzida no plasma seminal em relação aos participantes soronegativos ($p= 0,013$). Os participantes soropositivos apresentavam uma concentração média de proteína total no plasma seminal de $3774 \pm 648 \mu\text{g/ml}$, enquanto os participantes soronegativos apresentavam em média $4285 \pm 303 \mu\text{g/ml}$ (Figura 6-A).

Embora a concentração de proteína total estivesse maior no plasma seminal dos participantes soronegativos, a concentração de Lf esteve mais elevada entre os participantes soropositivos para o HIV ($p= 0,038$). Os plasmas seminais dos participantes soropositivos apresentavam uma concentração média de Lf de $115 \pm 70 \mu\text{g/ml}$ enquanto a concentração média de Lf nos plasmas seminais dos participantes soronegativos foi de $60 \pm 38 \mu\text{g/ml}$ (Figura 6-B).

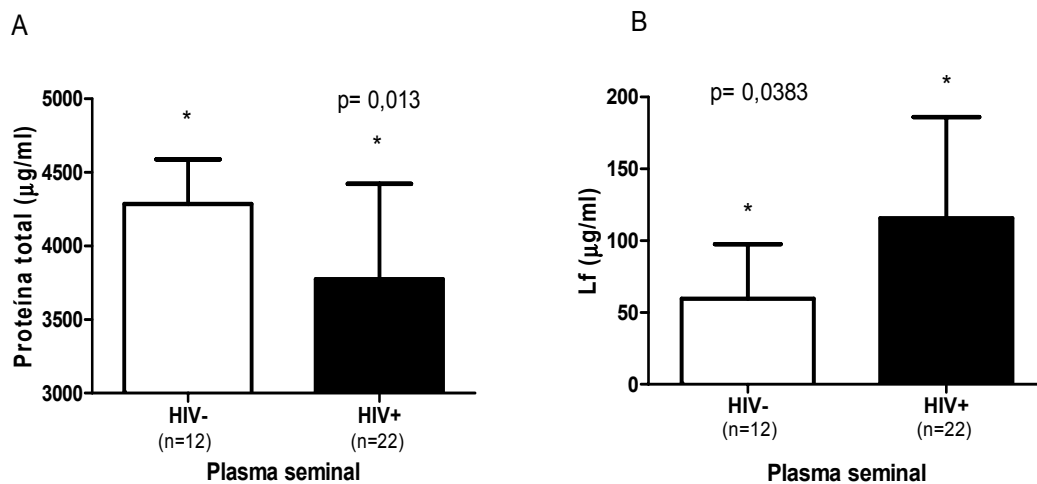


Figura 6. Concentração das proteínas totais e de Lf nos plasmas seminais de participantes soronegativos e soropositivos para o HIV (A) Concentrações das proteínas totais em plasmas seminais de participantes soronegativos (n=12) e soropositivos (n=22). (B) Concentrações de Lf nos plasmas seminais dos participantes soronegativos (n=12) e soropositivos (n=22) * Diferença estatisticamente significativa (teste Mann Whitney).

Lf: Lactoferrina.

p: P valor.

$\mu\text{g/ml}$: Microgramas por mililitro.

HIV-: Plasma seminal de participantes soronegativos para o HIV.

HIV+: Plasma seminal de participantes soropositivos para o HIV.

n: Número de experimentos.

4.1.5 Correlação entre carga viral do plasma seminal e sua capacidade de estimular a produção de CCL20 pelas células HEC-1A.

Todas as cargas virais para o HIV foram mensuradas nas amostras de plasmas seminais dos participantes soropositivos e comparadas à sua capacidade de estimular a produção de CCL20 pelas células HEC-1A. As cargas virais dos plasmas seminais dos 22 participantes infectados pelo HIV assim como suas capacidades de indução na produção de CCL20 pelas células HEC-1A estão demonstradas na tabela 4. Não se encontrou correlação entre a carga viral do HIV presente no plasma seminal e a estimulação da produção de CCL20 pelas células HEC-1A (Correlação de Spearman (r)= 0,3352; Intervalo de Confiança (IC)= - 0,1138 – 0,6706; p = 0,1272).

Tabela 4: Correlação entre a estimulação da produção de CCL20 pelas células HEC-1A e a carga viral do plasma seminal de 22 participantes soropositivos para o HIV-1.

Participantes	CCL20 index	CV
1	2,39	<50
2	3,31	<50
3	3,93	<50
4	4,49	<50
5	5,02	426210
6	5,08	<50
7	5,83	<50
8	6,37	<50
9	6,64	<50
10	6,95	<50
11	7,09	<50
12	7,36	261
13	7,91	<50
14	8,12	<50
15	8,18	25156
16	8,73	<50
17	8,88	<50
18	9,04	<50
19	9,33	3805
20	12,98	<50
21	13,53	97438
22	15,52	17531

Correlação de Spearman r = 0,3352; IC= -0,1138 – 0,6706; p = 0,1272.

CCL20 : *Quimiocin C-C motif ligand 20*. CCL20 index: Número de vezes que as células HEC-1A, estimuladas com plasmas seminais, produziram CCL20 em relação às células não tratadas (grupo controle).

CV: Carga viral do HIV em cópias virais por mililitro de plasma seminal.

r : Correlação de Spearman; IC: Intervalo de Confiança; p : p valor.

4.1.6 Correlação entre estimulação da produção de CCL20 pelas células HEC-1A e concentração de proteínas totais no plasma seminal.

Para esse estudo, verificou-se se a dosagem de proteína total dos plasmas seminais esteve correlacionada à sua capacidade de estimular a produção de CCL20 pelas células HEC-1A.

Não se encontrou correlação entre a dosagem de proteína total de plasmas seminais soropositivos e soronegativos para o HIV e a produção de CCL20 pelas células HEC-1A ($r = -0,1080$; IC= $-0,4390 - 0,2487$; $p = 0,5431$), conforme figura 7-A.

Tal relação se manteve quando se estudou separadamente os plasmas seminais de participantes soronegativos dos soropositivos para o HIV. A tabela 5 e a figura 7-B evidenciam a não correlação entre a dosagem protéica do plasma seminal e a estimulação da produção de CCL20 pelas células HEC-1A tratadas com os plasmas seminais dos 12 participantes soronegativos ($r = -0,1261$; IC= $-0,6638 - 0,4975$; $p = 0,6962$).

Resultados semelhantes foram observados no grupo dos participantes soropositivos para o HIV. Nenhuma correlação foi encontrada entre a dosagem de proteína total dos 22 plasmas seminais e sua capacidade de estimular a produção de CCL20 pelas células HEC-1A ($r = 0,1666$; IC= $-0,2867 - 0,5589$; $p = 0,4588$), conforme tabela 6 e figura 7-C.

Tabela 5. Concentrações de proteínas totais dos plasmas seminais de participantes soronegativos para o HIV e suas capacidades de estimular a produção de CCL20 pelas células HEC-1A.

Participante	Proteína total ($\mu\text{g/ml}$)	CCL20 index
1	3877	3,49
2	4601	4,49
3	4782	4,75
4	3964	4,88
5	4761	5,14
6	4102	5,20
7	4194	5,73
8	4343	5,77
9	4281	5,91
10	4307	6,22
11	4281	6,31
12	3928	6,75

($r = -0,1261$; IC= $-0,6638 - 0,4975$; $p = 0,6962$).

$\mu\text{g/ml}$: Microgramas por mililitro.

CCL20 : *Quimiocin C-C motif ligand 20*.

CCL20 index: Número de vezes que as células HEC-1A, estimuladas com plasmas seminais, produziram CCL20 em relação às células não tratadas (grupo controle).

HEC-1A: Células do epitélio monoestratificado endocervical.

Tabela 6. Concentrações de proteínas totais dos plasmas seminais de participantes soropositivos para o HIV e suas capacidades de estimular a produção de CCL20 pelas células HEC-1A

Participante	Proteína total (µg/ml)	CCL20 index
1	3110	2,39
2	4966	3,31
3	4051	3,93
4	3684	4,49
5	2864	5,02
6	3224	5,08
7	3691	5,83
8	4200	6,37
9	4427	6,64
10	3700	6,95
11	3817	7,09
12	3585	7,36
13	2558	7,91
14	2460	8,12
15	4197	8,18
16	4392	8,73
17	4775	8,88
18	3620	9,04
19	3908	9,33
20	3753	12,98
21	4311	13,53
22	3745	15,52

(r: 0,1666; IC: -0,2867 – 0,5589; p 0,4588).

µg/ml: Concentração de proteína total em microgramas por mililitro.

CCL20 : *Quimiocin C-C motif ligand 20*

CCL20 index: Número de vezes que as células HEC-1A, estimuladas com plasmas seminais, produziram CCL20 em relação às células não tratadas (grupo controle).

HEC-1A: Células do epitélio monoestratificado endocervical.

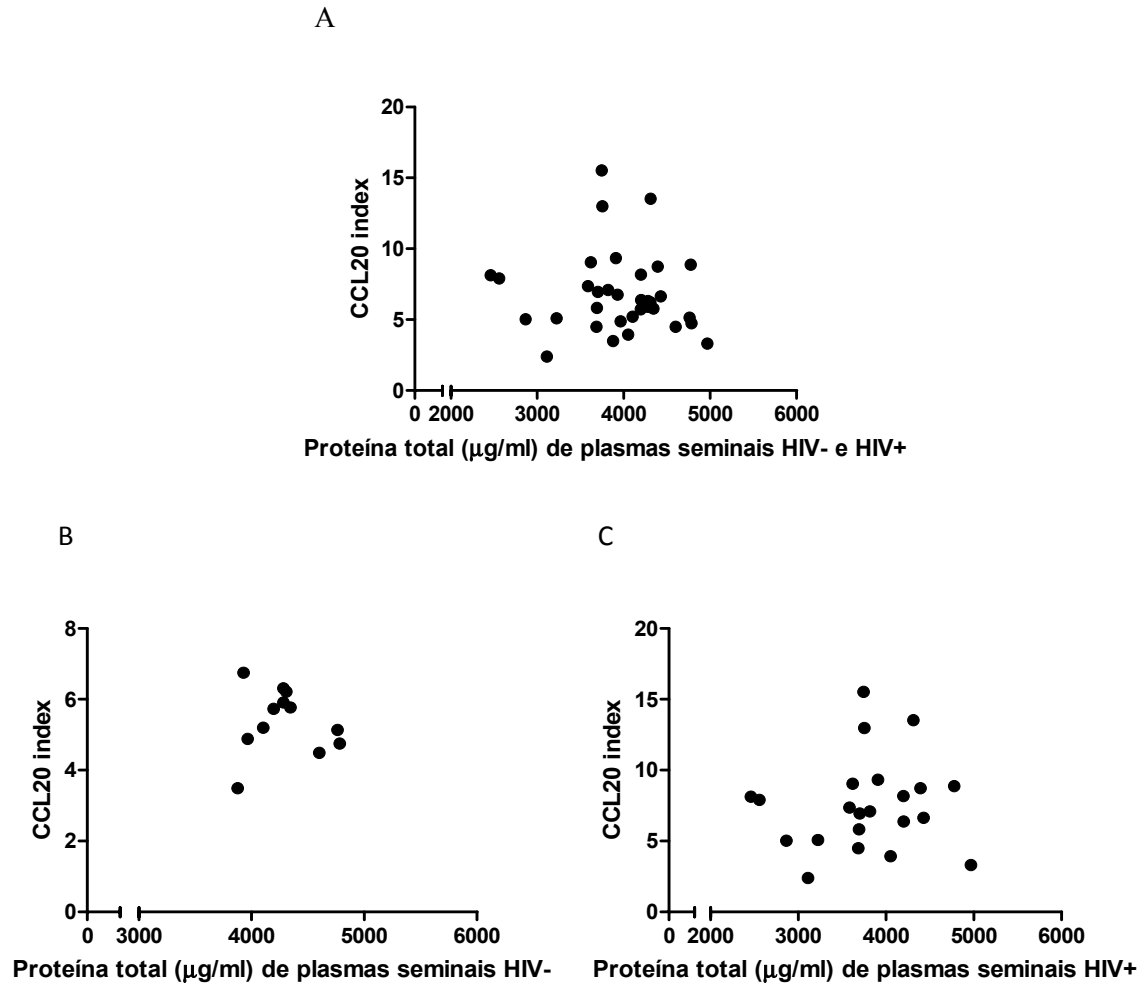


Figura 7. (A) Correlações entre a concentração de proteínas totais presentes nos plasmas seminais de participantes soronegativos (n 12) e soropositivos (n 22) para o HIV e produção de CCL20 em células HEC-1A estimuladas com esses plasmas seminais ($r = -0,1080$; IC= $-0,4390 - 0,2487$; $p = 0,5431$). (B) Correlação entre a concentração de proteína total e produção de CCL20 em células HEC-1A estimuladas com plasmas seminais de 12 participantes soronegativos ($r = -0,1261$; IC= $-0,6638 - 0,4975$; $p = 0,6962$). (C) 3. Correlação entre a concentração de proteína total e produção de CCL20 pelas células HEC-1A estimuladas com plasmas seminais de 22 participantes soropositivos ($r = 0,1666$; IC= $-0,2867 - 0,5589$; $p = 0,4588$).

CCL20 : *Quimiocin C-C motif ligand 20*.

CCL20 index: Número de vezes que as células HEC-1A, estimuladas com plasmas seminais, produziram CCL20 em relação às células não tratadas (grupo controle).

$\mu\text{g/ml}$: Microgramas por mililitros.

HEC-1A: Células do epitélio monoestratificado endocervical.

r: Correlação de Spearman.

IC: Intervalo de Confiança.

p: P valor.

4.1.7 Correlação entre estimulação da produção de CCL20 pelas células HEC-1A e concentração de lactoferrina no plasma seminal.

As concentrações da Lf nos plasmas seminais foram comparadas com suas respectivas capacidades de estimularem a produção de CCL20 pelas células HEC-1A. Observou-se uma correlação positiva estatisticamente significativa entre a concentração de Lf presente no plasma seminal de participantes soronegativos e soropositivos para o HIV e sua capacidade de estimular a produção de CCL20 em células HEC-1A ($r= 0,5557$; IC= $0,2581 - 0,7570$, $p= 0,0006$), conforme figura 8-A.

A mesma correlação entre a concentração de Lf no plasma seminal e a produção de CCL20 pelas células HEC-1A esteve presente quando se estudou somente os plasmas seminais soropositivos para o HIV ($r= 0,4613$; IC= $0,03592 - 0,7452$, $p= 0,030$). A tabela 7 e a Figura 8-B destacam a correlação positiva entre a concentração de Lf e a estimulação da produção de CCL20 pelas células HEC-1A tratadas com plasmas seminais de participantes soropositivos para o HIV.

Dentre os participantes soronegativos não se encontrou correlação estatisticamente significativa entre a concentração de Lf no plasma seminal e sua capacidade de estimular a produção de CCL20 pelas células HEC-1A ($r= 0,5105$; IC= $-0,1090 - 0,8444$, $p= 0,089$). A tabela 8 e a Figura 8-C apresentam a correlação entre as concentrações de Lf e as produções de CCL20 pelas células HEC-1A estimuladas com plasmas seminais de participantes soronegativos para o HIV. Embora tal correlação não seja estatisticamente significativa, tal resultado se deu, provavelmente, pelo baixo número de plasmas seminais de participantes soronegativos para o HIV que foram estudados.

Tabela 7. Concentrações de lactoferrina nos plasmas seminais dos participantes soropositivos para o HIV e suas respectivas capacidades de estimularem a produção de CCL20 pelas células HEC-1A.

Participante	Lf (µg/ml)	CCL20 index
1	18,1	2,39
2	19,9	3,31
3	15,9	3,93
4	69,7	4,49
5	219,0	5,02
6	209,9	5,08
7	119,7	5,83
8	2,7	6,37
9	137,0	6,64
10	88,2	6,95
11	41,2	7,09
12	100,6	7,36
13	192,7	7,91
14	161,3	8,12
15	92,1	8,18
16	149,4	8,73
17	140,6	8,88
18	165,9	9,04
19	46,5	9,33
20	140,5	12,98
21	206,5	13,53
22	205,3	15,52

$r = 0,4613$; IC= 0,03592 – 0,7452, $p = 0,030$

Lf (µg/ml): Concentração de Lactoferrina em microgramas por mililitro.

CCL20: *Chemokine C-C motif ligand 20*.

CCL20 index: Número de vezes que as células HEC-1A, estimuladas com plasmas seminais, produziram CCL20 em relação às células não tratadas (grupo controle).

r: Correlação de Spearman.

IC: Intervalo de confiança.

p: P valor.

Tabela 8. Concentrações de lactoferrina nos plasmas seminais dos participantes soronegativos para o HIV e suas respectivas capacidades de estimularem a produção de CCL20 pelas células HEC-1A.

Participante	Lf (µg/ml)	CCL20 index
1	69,2	5,73
2	8,9	4,49
3	23,1	3,49
4	71,5	4,88
5	84,7	6,75
6	52,2	6,22
7	89,5	5,20
8	47,2	6,31
9	31,7	5,14
10	151,6	5,91
11	52,0	4,75
12	34,4	5,77

$r = 0,5105$; IC = -0,1090 – 0,8444, $p = 0,089$

Lf: Lactoferrina

µg/ml: Microgramas por mililitro.

CCL20: *Quimiocin C-C motif ligand 20*.

CCL20 index: Número de vezes que as células HEC-1A, estimuladas com plasmas seminais, produziram CCL20 em relação às células não tratadas (grupo controle).

r: Correlação de Spearman

IC: Intervalo de confiança

p: P valor

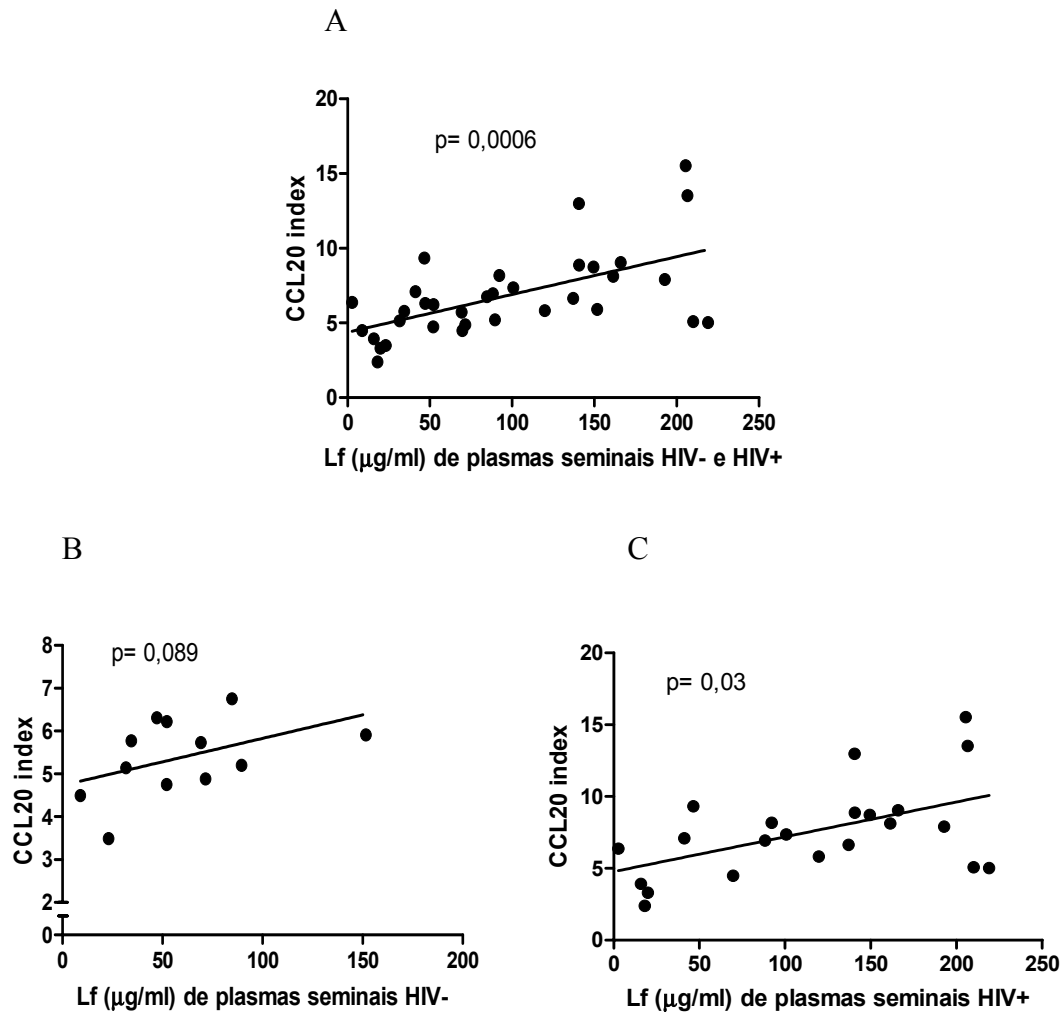


Figura 8. (A) Correlação entre a concentração da Lf e produção de CCL20 pelas células HEC-1A estimuladas com plasmas seminais de 34 participantes (soropositivos (n=22) e soronegativos para o HIV (n=12)) ($r=0,5557$; IC= 0,2581 – 0,7570, $p=0,0006$). (B) Correlação entre a concentração da lactoferrina e a produção de CCL20 pelas células HEC-1A estimuladas com plasmas seminais de 22 participantes soropositivos para o HIV ($r=0,4613$; IC= 0,03592 – 0,7452, $p=0,030$). (C) Correlação entre a concentração de Lf presente no plasma seminal e a estimulação da produção de CCL20 pelas células HEC-1A tratadas com plasmas seminais de 12 participantes soronegativos para o HIV ($r=0,5105$; IC= -0,1090 – 0,8444, $p=0,089$).

Lf: Lactoferrina.

CCL20: *Chemokine C-C motif ligand 20*.

CCL20 index: número de vezes que as células HEC-1A, estimuladas com plasmas seminais, produziram CCL20 em relação às células não tratadas (grupo controle).

µg/ml: Micrograma por mililitro.

r: Correlação de Spearman.

IC: Intervalo de confiança.

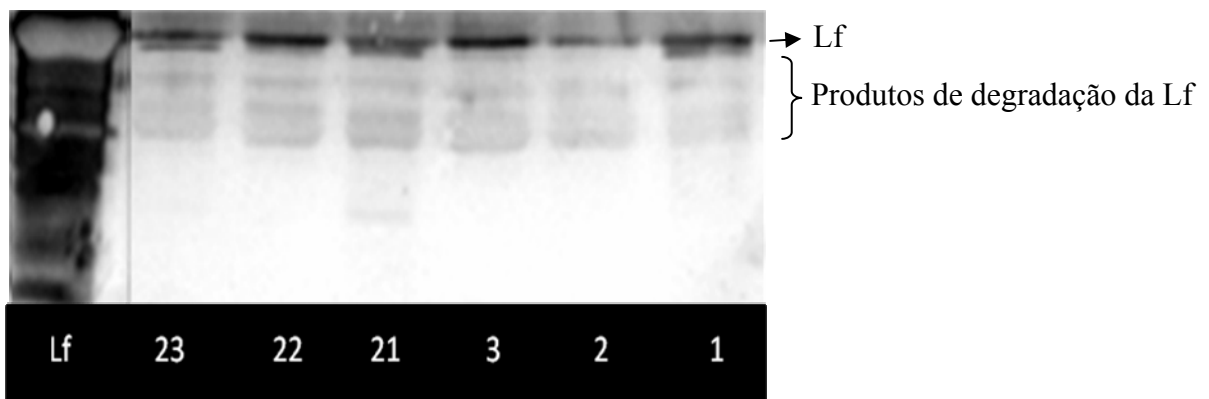
p: P valor.

4.1.8 Capacidade do peptídeo G-12-I, proveniente da clivagem da lactoferrina, de induzir a produção de CCL20 pelas células HEC-1A.

Para esse estudo, realizou-se Western blot com as três amostras de plasma seminal soropositivo para o HIV que mais estimularam a produção de CCL20 pelas células HEC-1A (amostras 20, 21 e 22) e com três amostras de plasma seminal soropositivos que menos estimularam a produção de CCL20 (amostras 1, 2 e 3), conforme visto na tabela 7, para evidenciar a presença de Lf e do peptídeo G-12-I, como descrito no material e método.

Conforme mostra a figura 9-A, a Lf esteve presente em todas as amostras. O peptídeo G-12-I pareceu estar mais presente nas amostras que mais induziram a produção de CCL20 pelas células HEC-1A estimuladas com plasma seminal de participantes soropositivos para o HIV (Figura 9-B).

A



B

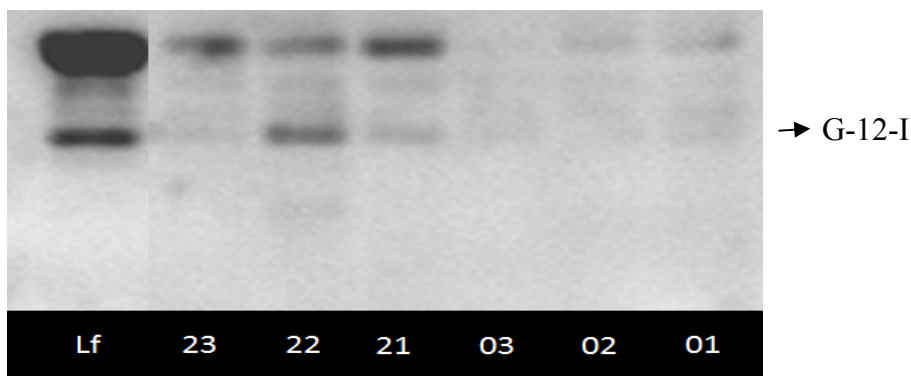


Figura 9: (A) Presença de Lf entre as amostras de plasmas seminais de participantes soropositivos para o HIV que mais promoveram a estimulação da produção de CCL20 (amostras 23, 22, 21) e que menos promoveram a produção de CCL20 pelas células HEC-1A (amostras 3, 2 e 1). (B) Presença do peptídeo G-12-I entre as amostras de plasmas seminais de participantes soropositivos que mais estimularam a produção de CCL20 pelas células HEC-1A (amostras 23, 22, 21) e que menos estimularam essa produção (amostras 3, 2 e 1).

CCL20: *Chemokine C-C motif ligand 20*.

HEC-1A: Células do epitélio monoestratificado endocervical.

4.1.9 Separação protéica do plasma seminal por cromatografia de afinidade

A fim de verificar se a Lf e seus produtos de clivagem, presentes no plasma seminal foram capazes de estimular a produção de CCL20 pelas células HEC-1A, realizou-se o fracionamento protéico do plasma seminal de um *pool* de 12 participantes soronegativos para o HIV, contabilizando um total de 28 frações. Cada fração foi testada em relação à sua capacidade de estimular a produção de CCL20 pelas células HEC-1A.

A tabela 9 apresenta a concentração de Lf e de proteína total em cada fração do *pool* do plasma seminal assim como sua capacidade de estimular a produção de CCL20 pelas células HEC-1A.

Tabela 9. Dosagem de lactoferrina, proteína total e estimulação da produção de CCL20 pelas células HEC-1A nas diferentes frações protéicas do plasma seminal de um *pool* de 12 participantes soronegativos para o HIV.

Frações do plasma seminal	Lf (µg/ml)	Proteína total (µg/ml)	CCL20 index
1	13,05	148	11,74
2	2,23	26	0,71
3	2,71	13	1,69
4	21,33	360	49,30
5	15,72	128	11,85
6	11,23	46	8,21
7	9,55	27	7,09
8	18,27	94	10,81
9	15,45	33	5,77
10	9,62	31	6,19
11	19,82	178	14,29
12	18,27	106	20,68
13	14,31	79	7,19
14	10,41	54	4,08
15	11,04	477	11,05
16	7,97	435	8,25
17	6,40	304	4,29
18	5,38	213	3,53
19	3,29	146	2,44
20	1,56	104	2,45
21	0,00	70	2,63
22	6,22	197	2,17
23	6,01	126	2,03
24	0,64	36	1,43
25	3,99	152	2,02
26	0,00	20	1,93
27	0,86	12	1,77
28	0,00	0	0,52

Lf (µg/ml): Dosagem de lactoferrina em microgramas por mililitro.

Proteína total (µg/ml): Dosagem de proteína em micrograma por mililitro.

CCL20: *Quimiocin C-C motif ligand 20*.

CCL20 index: Número de vezes que as células HEC-1A, estimuladas com plasmas seminais, produziram CCL20 em relação às células não tratadas (grupo controle).

A concentração de Lf no plasma seminal esteve aumentada nas primeiras frações do plasma seminal, principalmente entre as frações de 1 a 12, com quatro picos de concentrações nas frações 1, 4, 8 e 11 que foram coincidentes com os picos de proteína total. A partir da fração 12 verificou-se redução gradativa nas concentrações de Lf, observando-se três picos de proteínas totais nas frações 15, 22 e 25, conforme visualizado na figura 10.

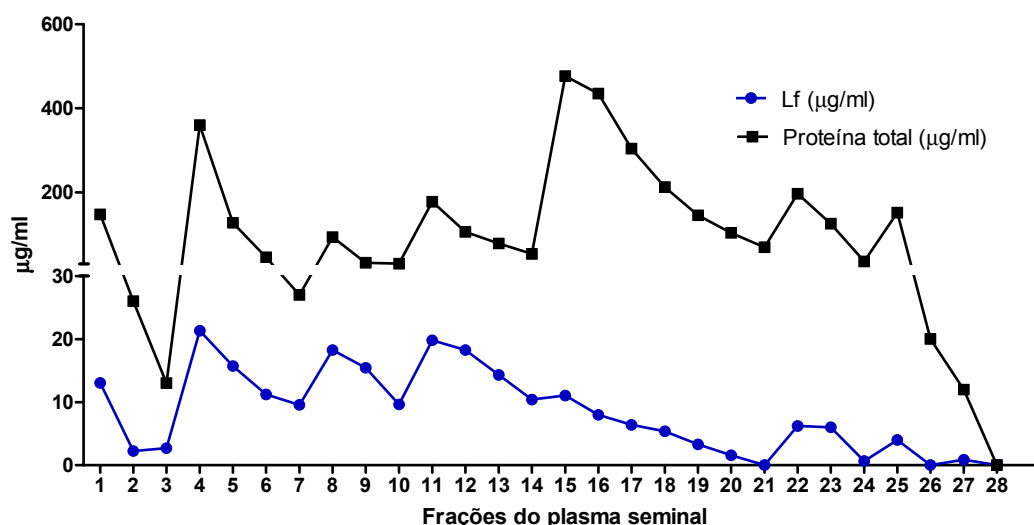


Figura 10: Fracionamento protéico de um *pool* de 12 participantes soronegativos para o HIV. Lf (µg/ml): Concentração de lactoferrina em microgramas por mililitro de plasma seminal. Proteína total (µg/ml): concentração de proteína total em micrograma por mililitro de plasma seminal.

A estimulação da produção de CCL20 pelas células HEC-1A esteve relacionada com a concentração de Lf presente na fração do plasma estudado ($p < 0,0001$; $r = 0,8942$; IC = 0,7773 – 0,9514). Verificamos que o aumento da concentração de Lf, como o observado entre as frações 1, 3-5, 7-9, 10 -13, corresponderam igualmente às frações que mais estimularam a produção de CCL20 pelas células HEC-1A, conforme destacado na figura 11.

A figura 12 mostra a presença da Lf nas frações de plasma seminal que mais estimularam a produção de CCL20 pelas células HEC-1A. Observa-se que as frações que mais estimularam a produção de CCL20 apresentavam a Lf mais evidenciada em suas bandas (frações 1, 4 e 11), assim como bandas que representam os produtos de degradação dessas proteínas.

Um pico de Lf também foi observado na fração 15, assim como aumento significativo na produção de CCL20 pelas células HEC-1A estimuladas com essa fração, no entanto, nessa fração, também se observou as maiores concentrações de proteínas totais.

Verificou-se a presença de Lf na fração 22, por Western blot (Figura 12), no entanto, não foram observadas bandas que representassem a produtos de clivagem da Lf, o que pode estar correlacionado à sua baixa estimulação da produção de CCL20 pelas células HEC-1A.

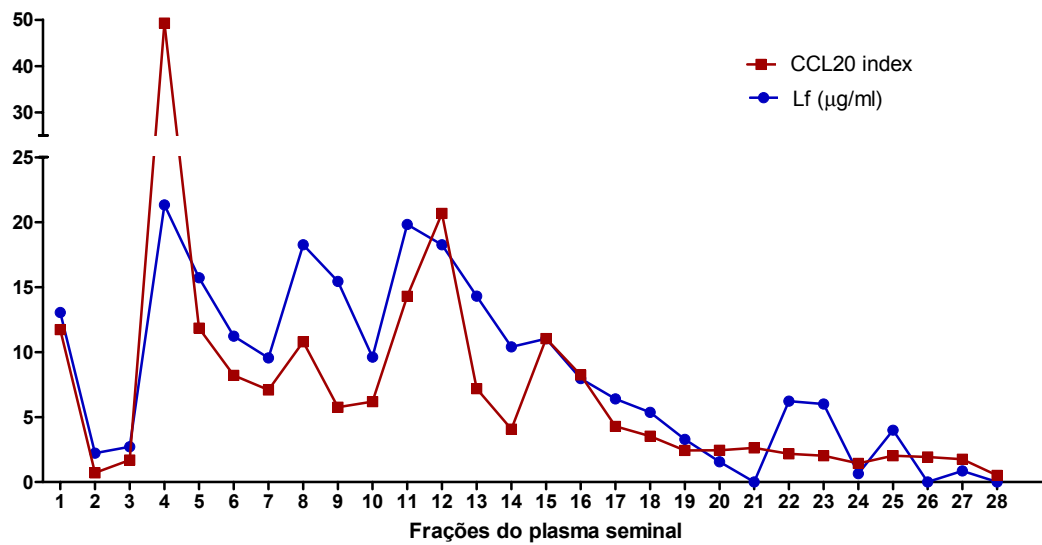


Figura 11: Relação entre Lf e produção de CCL20 pelas células HEC-1A estimuladas com as diferentes frações do plasma seminal ($r=0,08942$; IC= 0,7773 – 0,9514)

Lf (µg/ml): Dosagem da lactoferrina em micrograma por mililitro.

CCL20: *Quimiocin C-C motif ligand 20*

CCL20 index: Número de vezes que a fração estudada estimulou a produção de CCL20 em relação ao seu controle negativo.

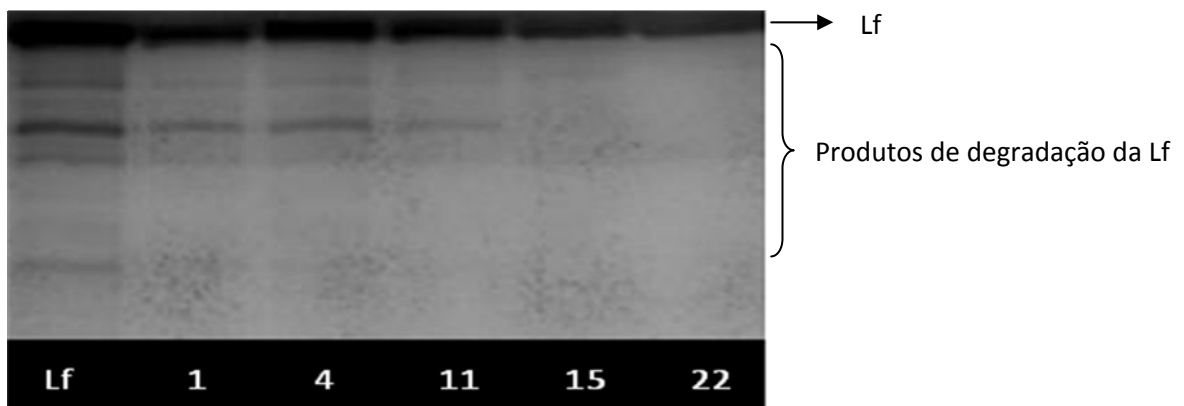


Figura 12: Presença de Lf e de seus produtos de clivagem nas frações de plasma seminal que mais estimularam a produção de CCL20.

CCL20: *Quimiocin C-C motif ligand 20*.

4.2 Resultados referentes ao estudo da saliva

Culturas de células HEC-1A foram estimuladas com 57 amostras de saliva diluídas 1:10 em meio de cultura DMEM-F12, a fim de estudar a influência da saliva na produção de CCL20 por células do epitélio monoestratificado endocervical.

Os participantes desse estudo foram os mesmos relacionados ao estudo do plasma seminal e da secreção vaginal.

Dos 57 participantes que compuseram a amostra, 34 eram do sexo masculino, com média de idade de $37,17 \pm 7,01$ anos e 23 do sexo feminino, com média de idade de $37,21 \pm 6,58$ anos. Quanto à soropositividade para o HIV, 34 participantes eram soropositivos para o HIV, e destes, 28 faziam uso de terapia antirretroviral.

4.2.1 Estudo da produção de CCL20 pelas células HEC-1A estimuladas com saliva de participantes soronegativos para o HIV.

A secreção de CCL20 foi mensurada por ELISA em sobrenadantes de células HEC-1A incubadas com meio de cultura DMEMF12 (grupo controle) com IL-1 β (controle positivo) e com plasma salivar de 23 participantes soronegativos para o HIV (diluído 1:10 em DMEM-f12) depois de 17 horas de incubação.

O sobrenadante das células HEC-1A tratadas apenas com o meio de cultura apresentaram uma concentração de CCL20 de $27,7 \pm 4,5$ pg/ml. No controle positivo, células HEC-1A tratadas com IL-1 β , a concentração de CCL20 em seu sobrenadante foi aumentada para 1169 ± 124 pg/ml, sendo esse valor uma média de um total de seis experimentos ($p < 0,001$). Notamos um grande aumento na produção de CCL20 pelas células HEC-1A tratadas com as 23 amostras de plasma salivar de participantes soronegativos em relação às células não tratadas (controle negativo), 1015 ± 378 pg/ml. ($p < 0,001$), conforme demonstrado na figura 13.

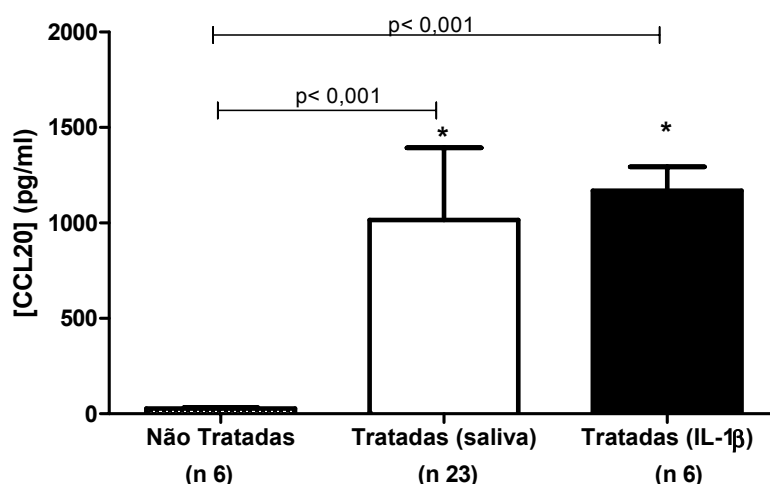


Figura 13: Produção de CCL20 pelas HEC-1A estimuladas com meio de cultura DMEM-F12 (grupo controle), IL-1 β 25ng/ml (controle positivo) ou saliva diluída 1:10 em meio de cultura DMEM-F12 (23 plasmas salivares de participantes soronegativos).

* Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle – teste de Mann Whitney.

CCL20: *Quimiocin C-C motif ligand 20*.

pg/ml : Picograma por mililitro.

IL-1 β : Interleucina 1-beta.

n: Número de experimentos.

4.2.2 Estudo da produção de CCL20 pelas células HEC-1A estimuladas com saliva de participantes soropositivos e soronegativos para o HIV.

A produção de CCL20 pelas células HEC-1A estimuladas com saliva foi quantificada em número de vezes que essas células secretaram CCL20 em relação às células tratadas apenas com meio de cultura (grupo negativo).

As 57 amostras de saliva foram divididas em dois grupos: soronegativos (n=23) e soropositivos (n=34) a fim de verificar se a soropositividade para o HIV influenciou na produção de CCL20 pelas células HEC-1A estimuladas com saliva. A saliva proveniente de participantes soronegativos para o HIV estimulou a produção de CCL20 pelas células HEC-1A em $36,14 \pm 12,22$ vezes em relação às células não tratadas. Já a saliva de participantes soropositivos para o HIV estimulou a produção em $39,46 \pm 14,43$ vezes em relação ao grupo controle, portanto, nenhuma diferença foi observada e as salivas de participantes soropositivos e soronegativos para o HIV tiveram capacidade semelhante de estimular a produção de CCL20 pelas células HEC-1A ($p = 0.9287$), conforme mostra a figura 14.

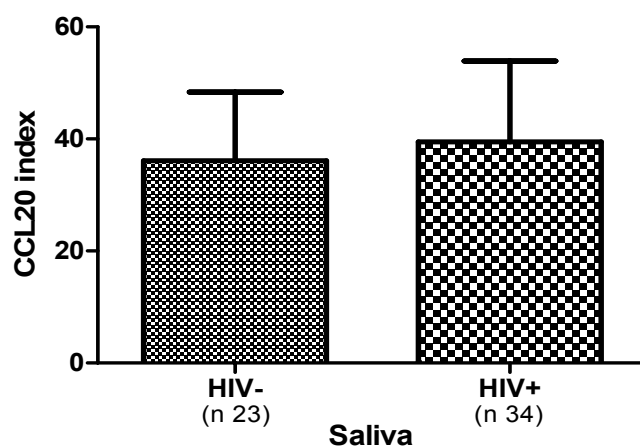


Figura 14. Estimulação da produção de CCL20 pelas células HEC-1A tratadas com saliva de participantes soropositivos e soronegativos para o HIV.

CCL20: *Quimiocin C-C motif ligand 20*

CCL20 index: Número de vezes que o plasma seminal estimulou a produção de CCL20 em relação às células não tratadas.

HIV-: Saliva de participantes soronegativos para o HIV.

HIV+: Saliva de participantes soropositivos para o HIV.

n: Número de experimentos.

Dentre os grupos de participantes soronegativos ou soropositivos para o HIV, foi avaliado se os fatores locais, representados pela condição oral dos participantes, foram determinantes na produção de CCL20 pelas células HEC-1A estimuladas com saliva. Para tanto se subdividiu cada grupo (soronegativo e soropositivo para o HIV) em três novos grupos: 1. Grupo de participantes saudáveis em relação à condição periodontal; 2. Participantes com gengivite; e, 3. Participantes com periodontite.

Entre os participantes soronegativos para o HIV não se verificou diferenças entre condição periodontal e estimulação da produção de CCL20 pelas células HEC-1A ($p=0,5194$). A saliva proveniente de 11 participantes saudáveis em relação à condição periodontal estimulou a secreção de CCL20 em $34,58 \pm 13,67$ vezes em relação ao grupo controle (células não tratadas), no entanto, aquelas provenientes de oito participantes com gengivite estimularam em $40,06 \pm 12,47$ vezes, enquanto aquelas provenientes de quatro participantes com periodontite estimulou em $32,59 \pm 6,8$ vezes (Figura 15-A).

Encontraram-se resultados semelhantes entre os participantes soropositivos para o HIV ($p=0,4615$): A saliva proveniente de participantes saudáveis em relação à condição periodontal ($n=11$) estimulou a secreção de CCL20 em $42,39 \pm 15,54$ vezes; com gengivite ($n=16$) estimulou em $35,40 \pm 9,10$ vezes, e a saliva proveniente de participantes com

periodontite (n= 7) estimulou a produção de CCL20 em $44,17 \pm 21,24$ vezes em comparação ao grupo controle (Figura 15-B).

A

B

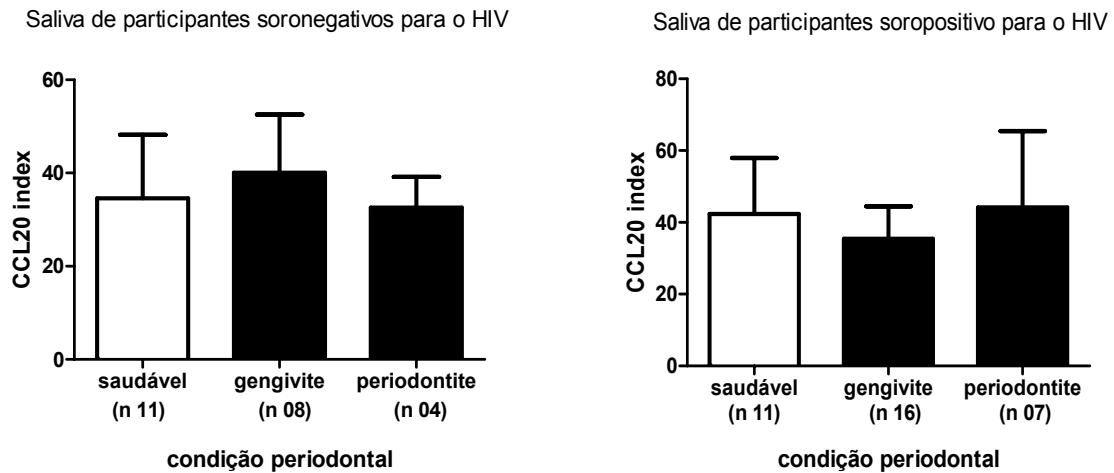


Figura 15. (A) Produção de CCL20 pelas células HEC-1A tratadas com saliva proveniente de participantes soronegativos para o HIV com diferentes condições orais ($p=0,5194$) (B) Produção de CCL20 pelas células HEC-1A tratadas com plasma salivar proveniente de participantes soropositivos para o HIV com diferentes condições orais ($p=0,4615$).

CCL20 index: Número de vezes que o plasma seminal estimulou a produção de CCL20 em relação às células não tratadas.

n: Número de experimentos.

p: P valor obtido pelo teste de Kruskal Wallis.

4.2.3 Concentração de proteína total salivar de participantes soropositivos e soronegativos para o HIV.

As concentrações de proteínas totais salivares foram expressas em microgramas por mililitro ($\mu\text{g/ml}$). Não se verificou qualquer relação entre a dosagem de proteína total e a condição oral dos participantes soropositivos ($p=0,2309$) ou soronegativos para o HIV ($p=0,2233$).

Entre participantes não infectados pelo HIV encontrou-se: Grupo dos pacientes com condição periodontal saudável (n= 11), $1375 \pm 661 \mu\text{g/ml}$; gengivite (n= 8) $1022 \pm 657 \mu\text{g/ml}$ e, participantes com periodontite (n= 4) $722 \pm 109 \mu\text{g/ml}$ (Figura 16-A).

Entre participantes infectados pelo HIV encontrou-se: Grupo dos pacientes com condição periodontal saudável (n= 11), $1622 \pm 1133 \mu\text{g/ml}$; gengivite (n= 16) $1089 \pm 365 \mu\text{g/ml}$; e, participantes com periodontite (n= 8) $1366 \pm 493 \mu\text{g/ml}$ (Figura 16-B).

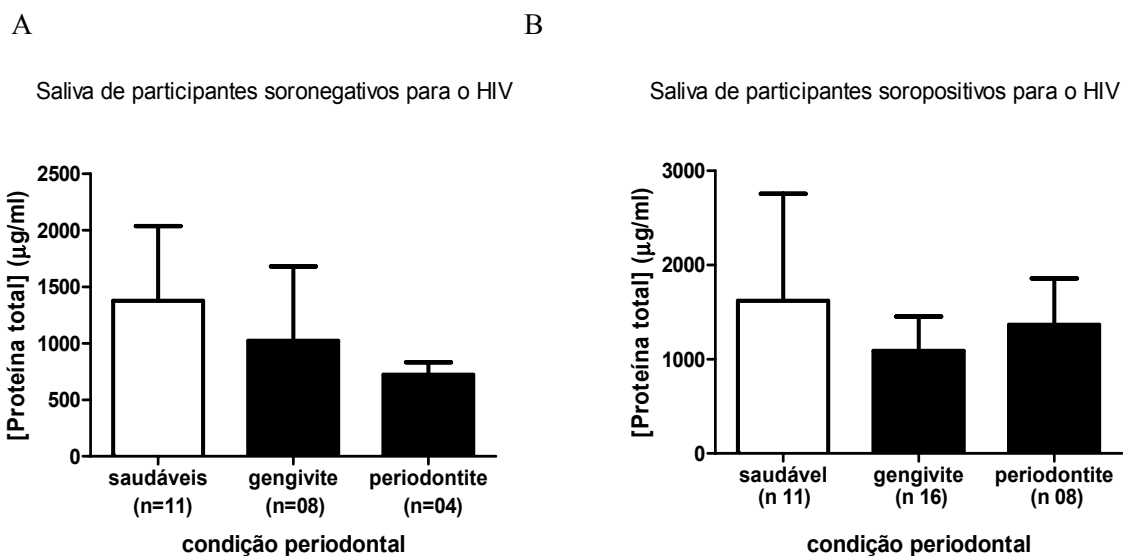


Figura 16. (A) Concentração de proteína total salivar de participantes soronegativos para o HIV com distintas condições periodontais ($p= 0,2233$) (B) Concentração de proteína total salivar de participantes soropositivos para o HIV em distintas condições periodontais ($p= 0,2309$).

$\mu\text{g/ml}$: Micrograma por mililitro.

n: Número de experimentos.

p: P valor obtido pelo teste de Kruskal Wallis.

4.2.4 Concentração de lactoferrina salivar em participantes soropositivos e soronegativos para o HIV.

As concentrações de Lf salivar foram expressas em microgramas por mililitro ($\mu\text{g/ml}$). Os 57 participantes foram divididos em dois grupos (soronegativos e soropositivos para o HIV) e cada grupo subdividido em três novos grupos em relação sua condição periodontal (periodontalmente saudável, com gengivite e com periodontite).

Dentre os participantes soronegativos para o HIV, verificou-se uma maior concentração de Lf entre os indivíduos que apresentavam inflamação periodontal (representada pela gengivite e periodontite) em relação aos indivíduos periodontalmente saudáveis ($p= 0,0019$). Os 11 participantes periodontalmente saudáveis apresentavam em média $17,49 \pm 8,36 \mu\text{g/ml}$ de Lf. Os oito participantes que apresentavam gengivite tiveram a

concentração de Lf aumentada para $35,03 \pm 10,98 \mu\text{g/ml}$, e os quatro participantes portadores de periodontite para $39,35 \pm 4,96 \mu\text{g/ml}$ ($p=0,0019$), conforme figura 17-A.

A mesma diferença de concentração de Lf entre os participantes com diferentes condições orais foram observadas entre os participantes soropositivos para o HIV ($p=0,008$). Dentre os 11 participantes periodontalmente saudáveis verificou-se concentração de Lf de $15,41 \pm 9,80 \mu\text{g/ml}$, já entre os participantes com gengivite e periodontite verificou-se que essas concentrações foram elevadas para $35,39 \pm 11,66 \mu\text{g/ml}$ e $32,95 \pm 12,99 \mu\text{g/ml}$, respectivamente ($p=0,008$), conforme demonstrado pela figura 17-B.

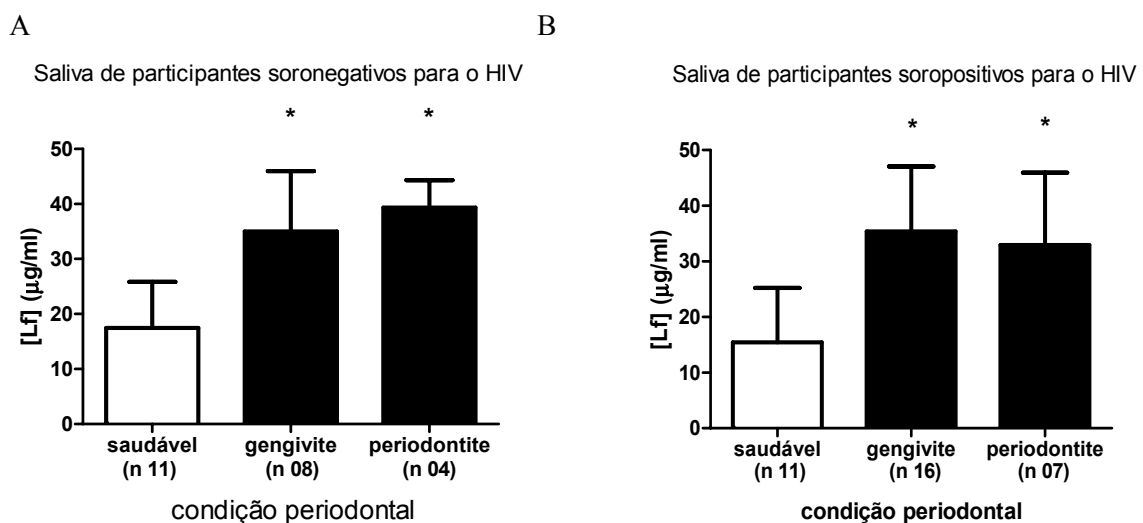


Figura 17. (A) Concentração de Lf salivar em participantes soronegativos para o HIV em distintas condições periodontais ($p=0,0019$) (B) Concentração de Lf salivar em participantes soropositivos para o HIV em distintas condições periodontais ($p=0,008$).

* Significância estatística em relação aos participantes periodontalmente saudáveis – Kruskal-Wallis.

Lf: Lactoferrina.

$\mu\text{g/ml}$: Micrograma por mililitro.

n: Número de experimentos.

p: P valor obtido pelo teste de Kruskal-Wallis.

4.2.5 Correlação entre a concentração de Lf e de proteína total salivar com a produção de CCL20 pelas células HEC-1A estimulada pela saliva.

As concentrações de proteína total e de Lf salivares foram comparadas com suas respectivas capacidades de estimularem a produção de CCL20 pelas células HEC-1A. Nenhuma correlação entre a concentração de proteína total salivar e sua capacidade de estimular a produção de CCL20 pelas células HEC-1A foi observada entre os 23 participantes

soronegativos para o HIV ($r = -0,3548$; IC= $-0,6763 - 0,08020$; $p = 0,0966$), conforme descrito pela figura 18-A e entre os 34 participantes soropositivos para o HIV ($r = -0,07349$; IC= $-0,4104 - 0,2811$; $p = 0,6796$), conforme figura 18-C.

Em relação à Lf, também não se observou correlação entre a Lf salivar e sua capacidade de estimular a produção de CCL20 pelas células HEC-1A entre os participantes soronegativos para o HIV ($r = 0,1808$; IC= $-0,2622 - 0,5609$, $p = 0,4090$), como descrito na figura 18-B e soropositivos para o HIV ($r = 0,07074$; IC= $-0,2837 - 0,4081$; $p = 0,6910$), conforme figura 18-D.

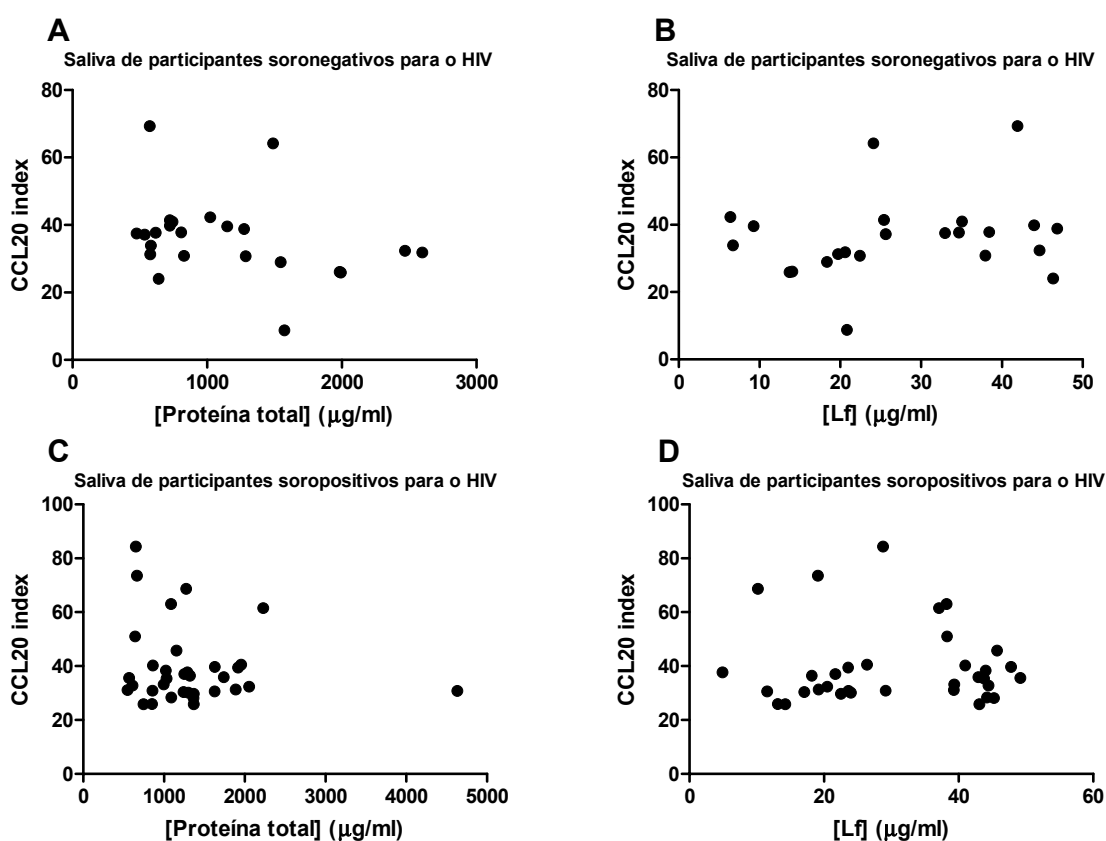


Figura 18. (A) Correlação entre a concentração da proteína total salivar e a estimulação da produção de CCL20 em células HEC-1A tratadas com o plasma salivar dos 23 participantes soronegativos ($r = -0,3548$; IC= $-0,6763 - 0,08020$; $p = 0,0966$). (B) Correlação entre a concentração da Lf no plasma salivar e a estimulação da produção de CCL20 em células HEC-1A tratadas com o plasma salivar de 23 participantes soronegativos ($r = 0,1808$; IC= $-0,2622 - 0,5609$, $p = 0,4090$). (C) Correlação entre a concentração da proteína total no plasma salivar e a estimulação da produção de CCL20 em células HEC-1A tratadas com o plasma salivar dos 34 participantes soronegativos ($r = -0,07349$; IC= $-0,4104 - 0,2811$; $p = 0,6796$). (D) Correlação entre a concentração da Lf no plasma salivar e a estimulação da produção de CCL20 em células HEC-1A tratadas com o plasma salivar de 34 participantes soropositivos ($r = 0,07074$; IC= $-0,2837 - 0,4081$; $p = 0,6910$).

µg/ml: Micrograma por mililitro.

HEC-1A: Células do epitélio monoestratificado endocervical.

CCL20: *Quimiocin C-C motif ligand 20*.

CCL20 index: Número de vezes que o plasma seminal estimulou a produção de CCL20 em relação às células não tratadas.

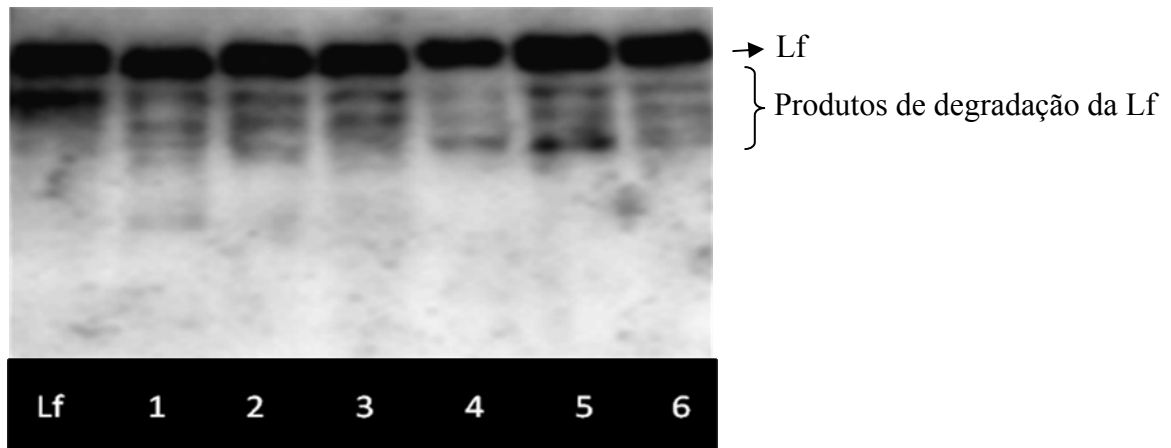
r: Correlação de Spearman. IC: Intervalo de confiança. p: P valor

4.2.6 Capacidade dos peptídeos G-12-I, provenientes da clivagem da lactoferrina, de induzirem a produção de CCL20 pelas células HEC-1A estimuladas com saliva de participantes soropositivos para o HIV.

Semelhante ao método para o estudo do plasma seminal, realizou-se Western blot nas amostras de plasmas salivares de participantes soropositivos para o HIV que mais estimularam a produção de CCL20 pelas células HEC-1A (amostras 1, 2 e 3 que estimularam a produção de CCL20 em 84,33; 73,57; e, 68,69 vezes em relação às células não tratadas, respectivamente) e as amostras salivares que menos estimularam a produção de CCL20 (amostras 4, 5 e 6 que estimularam a produção de CCL20 em relação às células não tratadas em 25,96; 25,87; e, 25,86 vezes, respectivamente), evidenciando a Lf e o peptídeo G-12-I, como descrito em material e método. Vale salientar que mesmo as amostras que menos estimularam a produção de CCL20, aumentaram muito a concentração de CCL20 em relação às células não tratadas (grupo controle).

Conforme mostra a figura 19-A, a Lf esteve presente em todas as amostras de maneira equivalente. O peptídeo G-12-I, diferentemente do estudo com o plasma seminal, esteve presente em todas as amostras, mesmo naquelas que menos estimularam a produção de CCL20, pois essas aumentaram a concentração de CCL20 em pelo menos 20 vezes em relação às células não tratadas (Figura 19-B).

A



B

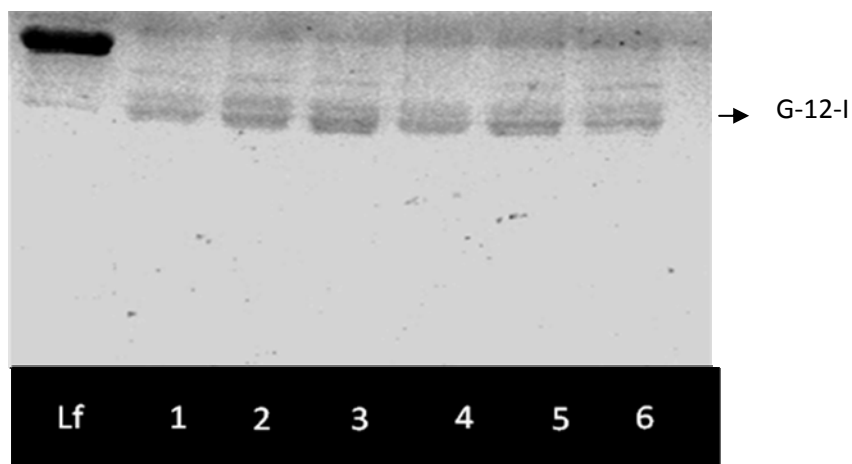


Figura 19: (A) Presença de Lf entre as amostras salivares que mais promoveram a estimulação da produção de CCL20 (amostras 1, 2 e 3) e as que menos promoveram a produção de CCL20 pelas células HEC-1A (amostras 4, 5 e 6). (B) Presença do peptídeo G-12-I entre as amostras salivares que mais estimularam a produção de CCL20 pelas células HEC-1A (amostras 1, 2 e 3) e que menos estimularam essa produção (amostras 4, 5 e 6).

Lf: Lactoferrina.

CCL20: *Quimiocin C-C motif ligand 20*.

4.3 Resultados referentes ao estudo do conteúdo vaginal

4.3.1 Características gerais dos participantes

Para esse estudo foram avaliadas 12 amostras do conteúdo vaginal de participantes soropositivas para o HIV e 11 amostras do conteúdo vaginal provenientes de participantes soronegativas para o HIV.

As participantes soropositivas para o HIV apresentavam em média $37,5 \pm 4,68$ anos de idade, e as participantes soronegativas para o HIV apresentavam em média $36,63 \pm 8,42$ anos.

Dentre as participantes soropositivas apenas uma não fazia uso de HAART. Todas as participantes foram submetidas a exame ginecológico de rotina e nenhuma apresentou qualquer infecção genital.

4.3.2 Estudo da produção de CCL20 pelas células HEC-1A estimuladas com conteúdo vaginal de participantes soronegativas para o HIV.

Células HEC-1A foram incubadas com meio de cultura (grupo controle) ou IL-1 β (controle positivo) ou conteúdo vaginal. Para a análise da produção de CCL20 pelas células HEC-1A, subtraiu-se da concentração de CCL20 no sobrenadante das células HEC-1A estimuladas com o conteúdo vaginal a concentração de CCL20 que o conteúdo vaginal já possuía, pela produção *in vivo* de CCL20 pelas células epiteliais vaginais. Para tal procedimento também se dosou a concentração de CCL20 diretamente no conteúdo vaginal.

O sobrenadante das células HEC-1A não tratadas (grupo controle, total de quatro experimentos) apresentaram concentração de CCL20 de $58,00 \pm 35,86$ pg/ml, essa concentração foi largamente aumentada para $773,75 \pm 71,60$ pg/ml quando as células HEC-1A foram tratadas com o controle positivo ($p = 0,0286$). Não se verificou aumento da produção de CCL20 pelas células HEC-1A estimuladas com o conteúdo vaginal em relação ao grupo controle ($p = 0,2256$). A concentração de CCL20 no sobrenadante das células HEC-1A estimuladas com 11 secreções vaginais (e subtraído a concentração de CCL20 já existente no conteúdo secreção vaginal) foi de $144,83 \pm 120$ pg/ml ($p = 0,2256$), ou seja, o conteúdo

vaginal proveniente de participantes soronegativos para o HIV não estimulou a produção de CCL20 pelas células HEC-1A quando comparada às células não tratadas (Figura 20).

Mesmo resultado obteve-se com o conteúdo vaginal proveniente de participantes soropositivas para o HIV. A concentração de CCL20 no sobrenadante de células HEC-1A estimuladas com o conteúdo vaginal de participantes soropositivos, subtraída a concentração de CCL20 já existente em cada amostra, foi de 78 ± 93 pg/ml ($p > 0,999$), ou seja, o conteúdo vaginal proveniente de participantes soropositivas para o HIV não foi capaz de estimular a produção de CCL20 pelas células HEC-1A, sendo esses níveis comparáveis a produção de CCL20 pelas células HEC-1A não tratadas (Figura 20).

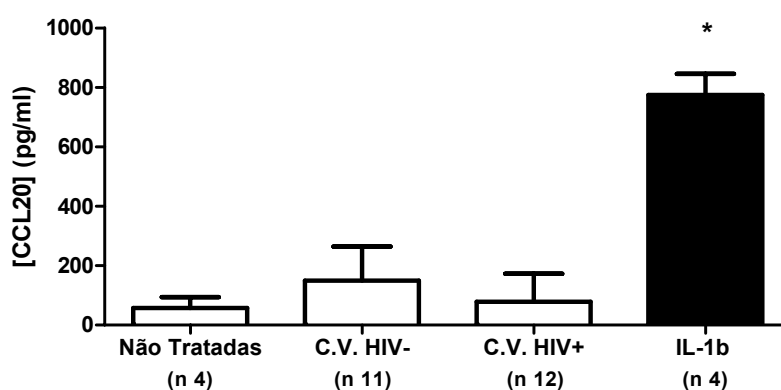


Figura 20: Produção de CCL20 pelas células HEC-1A estimuladas com meio de cultura DMEM-F12 (controle negativo), com o conteúdo vaginal de participantes soronegativas para o HIV ($p=0,2256$), com o conteúdo vaginal de participantes soropositivas para o HIV ($p>0,999$), e IL-1 β (controle positivo ($p<0,001$)). * Diferença de produção de CCL20 pelas células HEC-1A estatisticamente significativa em relação às células não tratadas – teste Mann Whiteny.

CCL20: *Quimiocin C-C motif ligand 20*.

HEC-1A: Células do epitélio monoestratificado endocervical.

IL-1 β : Interleucina 1-beta.

Pg/ml: picogramas por mililitros.

C.V. HIV-: Conteúdo vaginal de participantes soronegativas para o HIV.

C.V. HIV+: Conteúdo vaginal de participantes soropositivas para o HIV.

n: Número de experimentos.

4.3.3 Concentração de proteína total e de lactoferrina no conteúdo vaginal de participantes soronegativos e soropositivos para o HIV.

As concentrações de proteína total e de Lf no conteúdo vaginal estão descritas em microgramas por mililitro ($\mu\text{g/ml}$). Os participantes foram divididos em dois grupos:

participantes soropositivas para o HIV (n=12) e participantes soronegativas para o HIV (n=11).

Não se observou diferença estatisticamente significativa, entre as concentrações de proteínas totais presentes nos conteúdos vaginais de participantes soropositivas e soronegativas para o HIV ($p= 0,2604$). Entre as participantes soronegativas para o HIV, a concentração de proteína total foi de $1166 \pm 688 \mu\text{g/ml}$, enquanto nas participantes soropositivas para o HIV, essa concentração foi de $2241 \pm 1636 \mu\text{g/ml}$ ($p= 0,2604$), conforme a figura 21-A.

A concentração de Lf esteve aumentada nas participantes soropositivas para o HIV ($p= 0,0392$). Dentre as participantes soronegativas para o HIV a concentração de Lf na secreção vaginal foi de $13,3 \pm 9,6 \mu\text{g/ml}$, enquanto dentre as participantes soropositivas para o HIV, a concentração de Lf foi de $23,56 \pm 13,39 \mu\text{g/ml}$ (Figura 21-B).

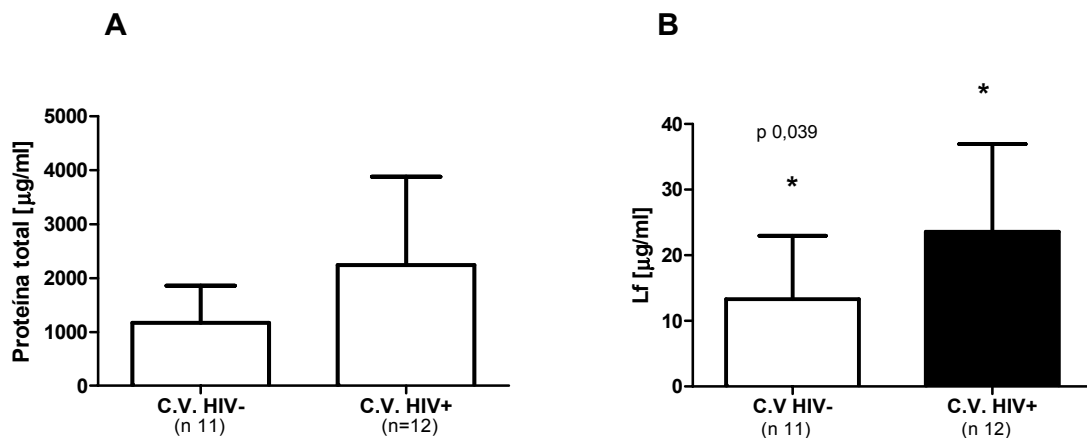


Figura 23. Concentração das proteínas totais e de Lf no conteúdo vaginal. (A) Concentrações das proteínas totais nos conteúdos vaginais de participantes soronegativas e soropositivas para o HIV ($p=0,2604$). (B) Concentrações de Lf nas secreções vaginais de participantes soronegativas e soropositivas para o HIV ($p= 0,0392$).

* Diferença estatisticamente significativa – Teste Mann Whitney.

$\mu\text{g/ml}$: Micrograma por mililitro.

C.V HIV- = Conteúdo vaginal de participantes soronegativas para o HIV.

C.V. HIV+: Conteúdo vaginal de participantes soropositivas para o HIV.

n: Número de experimentos.

Lf: Lactoferrina.

5 DISCUSSÃO

A aids é uma doença de alta letalidade e ainda incurável. A partir de 1996, devido à implementação da HAART, tornou-se uma doença com maior chance de controle, o que proporcionou uma melhor qualidade de vida aos pacientes infectados pelo HIV. No entanto, esforços são empregados diariamente para a descoberta de uma vacina ou cura dessa doença.

Avanços como a redução da transmissão vertical foi obtida com cuidados pré-natais e pós-natais e a HAART teve fundamental importância nesse avanço. A redução da carga viral das mães infectadas pelo HIV culmina em menor prevalência de transmissão para seu filho. A zidovudina (AZT) ministrada durante o parto à mãe soropositiva tem por finalidade a redução da carga viral a níveis mínimos durante o parto. Cuidados posteriores ao nascimento como o não aleitamento pela mãe soropositiva e busca de bancos de leite reduzem o risco de transmissão pelo HIV durante essa fase do desenvolvimento da criança (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Em relação à transmissão sexual, no entanto, não existem níveis seguros de carga viral que comprovadamente reduzam essa via de transmissão. Tal fato se deve, principalmente, à compartimentalização que o HIV sofre nos diferentes fluidos corpóreos. Também pode contribuir o fato de que distintas cepas do HIV podem ser encontradas em diferentes fluidos corpóreos (PINTO, 2007). Assim a difusão e eficiência dos ARV não são exatamente as mesmas nos diferentes tecidos, secreções e fluidos humanos. Não é incomum que um paciente em uso de ARV possua carga viral indetectável no plasma sanguíneo e apresente cargas virais discordantes no plasma seminal (LIUZZI, et al 2003), conteúdo vaginal ou saliva. Tal fato dificulta o estabelecimento de níveis seguros de carga viral que diminuam seu papel na transmissão heterossexual do HIV (LIUZZI, et al 2003; VERGARA; BARROSO, 2006).

Atualmente a transmissão heterossexual é a forma de transmissão mais comum do HIV. Estão entre as mulheres heterossexuais os maiores índices de transmissão do HIV na atualidade (CONH; CLARK, 2003, NUNES et al., 2004).

Do ponto de vista anatômico, as mulheres são mais susceptíveis à contaminação pelo HIV, por possuírem uma grande superfície de mucosa vaginal que se expõe ao sêmen masculino, o qual, por sua vez, contém maiores concentrações de vírus do que o fluido vaginal (CHIRIBOGA, 1997). Não apenas o plasma seminal pode entrar em contato com a mucosa vaginal feminina durante o ato sexual, mas microsangramentos também são comuns, o que eleva ainda mais o risco de transmissão para esse vírus (GUIMARÃES; VLAHOV; CASTILHO, 1997).

O plasma seminal apresenta propriedades que conferem vantagem e sobrevida aos espermatozoides dentro do hostil trato genital feminino. No entanto, uma grande resposta pró-

inflamatória, caracterizada pela presença abundante de leucócitos é observada no período pós-coito em animais e humanos. Os componentes do plasma seminal que estão envolvidos na inicialização da reação leucocitária ainda não são conhecidos. Durante a relação heterossexual, a ejaculação masculina deposita milhões de proteínas pró-inflamatórias na mucosa vaginal. Como apenas uma parte dos espermatozóides será utilizada para a fertilização, a maioria dos espermatozóides é removida da mucosa genital feminina. As células de defesa presentes na mucosa vaginal pós-coito são principalmente neutrófilos, que tem como principal função a fagocitose dos espermatozóides descartados durante a fertilização (DENISON et al., 1999).

O sêmen masculino representa o principal meio para a transmissão do HIV em todo o mundo. No sêmen estão presentes três grandes fontes de vírus infecciosos: vírions livres, leucócitos infectados e virions associados aos espermatozóides. O HIV presente no plasma seminal têm se mostrado capaz de penetrar através da superfície mucosa vaginal mediada por células alvos do HIV em especial as células de Langerhans. As células de Langerhans presentes na mucosa vaginal são conhecidas como “cavalo de Tróia” por facilitarem a passagem do HIV pela mucosa vaginal e apresentá-los ao LTCD4⁺ (PIGUET; BLAUVELT, 2002).

A CCL20 é uma potente quimiocina responsável pela quimioatração de células de Langerhans e, portanto, sua produção pelas células epiteliais da mucosa vaginal está relacionada ao aumento de risco de infecção pelo HIV (DE WITTE; NABATOV; GEIJTENBEEK, 2008). No presente estudo, verificou-se que o plasma seminal de pacientes soropositivos e soronegativos para o HIV é capaz de estimular a produção de CCL20 em cultura de células do epitélio monoestratificado endocervical. O plasma seminal de participantes soronegativos induziu a produção de CCL20 em $5,38 \pm 0,91$ vezes em relação às células tratadas apenas com meio de cultura (grupo controle) e o plasma seminal de participantes soropositivos estimulou em $7,57 \pm 3,26$ vezes em relação às células não tratadas. Portanto, o plasma seminal oriundo de participantes soropositivos para o HIV promoveu uma maior indução na produção de CCL20 pelas células HEC-1A, em comparação aos participantes soronegativos para o HIV. Tal resultado corrobora com os resultados encontrados por Berlier et al. (2006), que também verificaram maior aumento na produção de CCL20 em cultura de células do epitélio pluriestratificado vaginal (SiHa) estimuladas com plasma seminal soropositivo para o HIV. Embora no trabalho de Berlier et al. (2006), devido ao baixo número de participantes, não foi verificado diferença estatisticamente significativa entre indivíduos soropositivos e soronegativos para o HIV. Outro fator que pode ser apontado

como responsável pela diferença entre os dois trabalhos foi o uso das células HEC-1A no presente estudo. As células HEC-1A são células que, quando estimuladas, promovem maior produção de CCL20 em comparação as células do epitélio pluriestratificado da mucosa genital feminina (células SiHa). A opção pelo uso da linhagem de células HEC-1A não foi apenas por serem responsáveis pela maior produção de CCL20, mas, principalmente, por essas células estarem associadas às regiões de maiores riscos para a entrada do HIV pela mucosa vaginal (zona de transição e epitélio monoestratificado).

Os resultados aqui apresentados também estão de acordo com estudos prévios apontando que o plasma seminal está envolvido na secreção de diversas citocinas pelas células da mucosa vaginal (NAKAYAMA et al, 2001). Em 2005, Cremel et al. demonstraram que as células do epitélio pluriestratificado vaginal aumentaram sua secreção de CCL20 em resposta ao estímulo pela citocina pró-inflamatória IL-1 β . No presente estudo demonstrou-se que o plasma seminal proveniente de participantes soronegativos e soropositivos para o HIV produz efeitos similares sobre as células do epitélio monoestratificado vaginal, sugerindo que continham componentes capazes de gerar resposta não específica sobre as células da mucosa vaginal, culminando no estímulo da secreção de CCL20 por essas células.

Um grande número de citocinas presentes no plasma seminal pode estar envolvido com estimulação da produção de CCL20 pelas células da mucosa genital feminina. A produção de CCL20 pelas células epiteliais estimuladas com citocinas foi descrita em outros trabalhos (KASER et al, 2004; NAKAYAMA et al, 2001). Inicialmente a produção de CCL20 foi reportada em tecidos como o fígado e pulmão. Estudos subsequentes estudos comprovaram que a CCL20 também é normalmente expressada pelas células epiteliais de tecidos mucosos humanos (NAKAYAMA et al, 2001). Em 2001, Nakayama et al. em estudo sobre a estimulação de queratinócitos humanos com interleucina- 1 alfa (IL-1 α) e TNF- α , verificaram aumento expressivo da produção de CCL20 e correlacionaram essa estimulação como à atração de células que expressavam CCR6, dentre elas as células dentríticas imaturas e células T de memória e efetoras.

Para Kaser et al. (2004), existe o aumento objetivo da expressão de CCL20 em células provenientes do cólon em pacientes com doenças inflamatórias intestinais, dentre elas pacientes com doença de Crohn e colite ulcerativa. Ainda nesse trabalho, os autores verificaram que culturas de células provenientes do cólon aumentavam a secreção de CCL20 quando estimuladas com a citocina pró-inflamatória TNF- α .

A produção de muitos fatores pró-inflamatórios produzidos por células do trato genital feminino após contato com plasma seminal já foram descritos *in vitro* e *in vivo*. Denison et

al.(1999), investigaram os efeitos do plasma seminal sobre a produção de citocinas por cultura de células e verificaram que a prostaglandina presente no plasma seminal pôde induzir a produção de citocinas pró e antiinflamatórias pelas células cervicais. Em 2003, Gutsche et al. também verificaram a influência do plasma seminal sobre a expressão de RNAm de citocinas em cultura de células do epitélio endometrial e observaram que esse epitélio quando estimulado secreta citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β e interleucina 6 (IL-6).

O estudo dos fatores inflamatórios produzidos pelas mucosas do trato reprodutor feminino que estiveram em contato com o plasma seminal é de grande importância, principalmente quando relacionado à entrada do HIV, devido à conhecida capacidade do CCL20 de quimioatrair células dendríticas, dentre elas as células de Langerhans, que são conhecidas como o “cavalo de Tróia” do HIV, apresentando-o aos linfócitos TCD4⁺ (DIEU-NOSJEAN et al, 2000).

A relação entre as células epiteliais da mucosa vaginal e o sêmen durante a transmissão heterossexual deve ser considerada para melhor entendimento dos mecanismos de infecção pelo HIV. Tais achados teriam importantes implicações no desenvolvimento de abordagens antivirais em mucosa (BERLIER et al, 2006).

No presente estudo, os participantes soropositivos para o HIV apresentaram maiores concentrações de Lf em seu plasma seminal do que os participantes soronegativos. Essa glicoproteína é produzida por leucócitos polimorfonucleares e glândulas exócrinas, estando presente em vários fluidos biológicos e superfícies mucosas, durante infecções microbianas e doenças auto-imunes. No entanto, os níveis de Lf são decrescidos no plasma sanguíneo em pacientes sintomáticos infectados pelo HIV, devido à queda do número de neutrófilos circulantes (DEFER et al., 1995). A Lf é uma glicoproteína importante da imunidade humoral não específica e possui um conhecido efeito protetor frente à infecção pelo HIV (BERKHOUT, 2005; HARMSSEN et al., 1995; KAZMI et al., 2006; NG et al., 2001). Esta proteína é capaz de reduzir a capacidade das células dendríticas de capturar antígenos, dentre eles o HIV, devido sua interferência com a *gp* 120 viral e o receptor DC-SIGN (GROOT et al., 2005). No entanto, se a Lf possui um efeito protetor frente à infecção pelo HIV, os peptídeos de clivagem provenientes dessa proteína apresentam atividade pró-inflamatória (KOMINE et al., 2005; KOMINE et al., 2007), e, portanto, amostras de plasma seminal com altas concentrações de Lf, teoricamente apresentariam maiores concentrações de seus produtos de clivagem.

No presente estudo, verificou-se uma grande correlação entre a concentração de Lf no plasma seminal e a produção de CCL20 pelas células HEC-1A estimuladas com esses

plasmas seminais, ou seja, as amostras de plasma seminal que apresentavam maiores concentrações de Lf foram as que mais induziram a produção de CCL20 pelas células HEC-1A. Não podemos afirmar que a Lf presente no plasma seminal seja a responsável pela produção de CCL20, já que pode haver fator externo que esteja relacionado ao aumento da Lf e da produção de CCL20, concomitantemente.

Em estudo anterior, realizado no GIMAP (resultados não publicados), o peptídeo de clivagem da lactoferrina (G-12-I) foi capaz de aumentar a secreção de CCL20 pelas células do epitélio pluriestratificado vaginal (SiHa) em uma relação dose dependente, ou seja, quanto maior a concentração de G-12-I, maior foi a estimulação da secreção de CCL20 por essas células. Vários esforços foram despendidos durante o desenvolvimento do presente trabalho a fim de se dosar as concentrações do peptídeo G-12-I nos plasmas seminais utilizados nesse estudo, com o intuito de correlacionar sua concentração à estimulação da produção de CCL20 pelas células HEC-1A promovida pela estimulação com plasmas seminais. Não foi obtido êxito em tal dosagem, e, por conseguinte, o presente trabalho limitou-se a mostrar, utilizando-se Western blot, que os plasmas seminais que mais estimularam a produção de CCL20 apresentavam bandas mais evidenciadas que representavam o peptídeo de clivagem da Lf. Esse resultado ainda é inconclusivo, e, portanto, novos esforços são necessários para comprovar a participação dos peptídeos de clivagem da lactoferrina, em especial o peptídeo G-12-I.

Elaborou-se a hipótese de que os peptídeos de clivagem da Lf estivessem relacionados ao aumento da produção de CCL20, pois segundo Komine et al. (2007), tais peptídeos apresentam atividades pró-inflamatórias, relacionadas, por exemplo, ao estadiamento clínico da periodontite. Segundo a literatura médica, citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α (KASER et al, 2004), e a IL-1 β (CREMEL et al, 2005) são capazes de aumentar a secreção da produção de CCL20 em culturas celulares. A partir de tais premissas, nossa hipótese foi de que o peptídeo de clivagem da Lf estivesse também associado a tal estimulação. O que foi confirmado, de acordo com o estudo do GIMAP onde se observou o aumento da produção de CCL20 pelas células SiHa estimuladas com o peptídeo G-12-I (dados não publicados).

Outro resultado do presente estudo que converge com a participação da Lf e de seus produtos de clivagem como fatores ativadores do aumento da secreção de CCL20 pela mucosa genital feminina, foram os resultados da cromatografia de afinidade, realizada em um *pool* de 12 participantes soronegativos para o HIV. Nesse experimento, realizou-se o fracionamento protéico de um *pool* de plasma seminal avaliando as concentrações de Lf e

sua capacidade de induzir a produção de CCL20 pelas células HEC-1A. As amostras do fracionamento que mais induziram a produção de CCL20 foram aquelas onde se observou maiores concentrações de Lf e, conseqüentemente, de seus produtos de clivagem como demonstrado através do Western blot.

Achado paralelo ao presente estudo foi à menor concentração de proteínas totais no plasma seminal de participantes soropositivos para o HIV quando comparados aos participantes soronegativos para o HIV. Não encontramos estudos que enfatizassem apenas a concentração de proteínas total no plasma seminal. No entanto, Crittenden, Handelsman e Stewart (1992), em estudo analítico da qualidade do plasma seminal, verificaram que as amostras seminais de pacientes soropositivos para o HIV apresentavam menor número de espermatozóides móveis e menor número de células redondas, sendo mais viscosos do que os sêmens de pacientes soronegativos para o HIV. Nesse mesmo trabalho, os autores não observaram nenhum efeito deletério do tratamento com AZT sobre o sêmen. Em 1994, Politch et al. em estudo qualitativo do sêmen de 166 pacientes soropositivos para o HIV, verificaram que os pacientes que estavam em estágios iniciais da infecção pelo HIV não apresentavam quaisquer mudanças nas características do sêmen em relação aos plasmas seminais de pacientes soronegativos para o HIV. No entanto, pacientes em estágios avançados da doença tiveram significativa redução de espermatozóides, assim como aumento de suas formas anormais. Nesse mesmo estudo, os pacientes que faziam uso de AZT e estavam em estágios avançados da doença, apresentaram resultados compatíveis com a normalidade.

Um fator ainda não estudado, que pode apresentar correlação com a transmissão heterossexual do HIV é o efeito da saliva sobre a mucosa genital feminina. Tal estudo se justifica, pois a saliva está entre os lubrificantes mais utilizados durante o ato sexual, principalmente durante a relação sexual anal e vaginal (SMITH et al., 1998). Em 2007, Hassan et al. desenvolveram estudo em 237 mulheres profissionais do sexo e observaram que 18% das participantes faziam uso da saliva como lubrificante durante o ato sexual. Nesse mesmo trabalho, os autores relataram maior incidência de bacterioses vaginais nas participantes que utilizavam a saliva como lubrificante durante o ato sexual. Infecções bacterianas ou outros tipos de infecções na mucosa vaginal podem facilitar a penetração do HIV pela mucosa genital feminina, seja pela maior fragilidade do epitélio infeccionado, seja pelo aumento da presença de células de defesa, principalmente leucócitos, que são células alvo para esse vírus.

Para Smith et al. (1998), o uso da saliva como lubrificante esteve mais correlacionado ao ato sexual anal, seguido pelo sexo vaginal e oral. Esse trabalho também relacionou o uso da saliva como fator de ruptura do preservativo masculino.

Analizando o uso da saliva como lubrificante durante o ato sexual, deslumbrou-se a possibilidade de estudar os efeitos da saliva sobre a mucosa endocervical (*in vitro*) correlacionando este evento ao risco da infecção pelo HIV.

A saliva possui algumas proteínas com atividade comprovadamente anti-HIV. Dentre as proteínas salivares inibidoras do HIV podemos destacar o SLPI (CAMPO et al., 2006) e a Lf (KAZMI et al., 2006). A saliva possui menos de uma cópia viável de HIV por mililitro, e, portanto, é um fluido corpóreo com infectibilidade para o HIV muito reduzida (MALAMUD et al., 1997). Embora a cavidade oral possa apresentar sítios cruentos, devido patologias como a gengivite e a periodontite, poucos trabalhos têm relatado o contágio pelo HIV por essa via (CAMPO et al. 2006).

Embora diversos trabalhos tenham estudado as propriedades antivirais da saliva e sua proteção aos tecidos orais, desconhecemos trabalhos que descrevam sua influência sobre a mucosa genital feminina.

A saliva é rica em proteínas e peptídeos pró-inflamatórios como o TNF- α e a IL-1 β , estando essas citocinas presentes principalmente em pacientes que apresentam algum nível de inflamação periodontal como a gengivite ou periodontite (SEXTON et al., 2011). Sabe-se que a CCL20, é uma citocina com propriedades quimiostáticas para células de defesa como as células dentríticas e células de Langerhans, que são células alvo para a infecção pelo HIV e é secretada em diversas mucosas, dentre elas a mucosa vaginal. Sabe-se também que a produção dessa citocina é aumentada quando a mucosa entra em contato com citocinas pró-inflamatórias, principalmente as TNF- α (KASER et al, 2004) e IL-1 β (CREMEL et al., 2005). Sendo rica a presença dessas citocinas na saliva, levantou-se a hipótese de que as citocinas presentes nesse fluido pudessem estimular a produção da CCL20 pelas células do epitélio monoestratificado endocervical. Com o intuito de se verificar esta hipótese, dividiu-se os participantes em soropositivos e soronegativos para o HIV, subdividido-os de acordo com sua condição periodontal, a fim de se verificar se a saliva dos participantes que apresentavam algum nível de inflamação periodontal (gengivite ou periodontite) foi capaz de promover uma maior estimulação da produção de CCL20 pelas células HEC-1A que aqueles participantes que apresentavam uma condição periodontal saudável.

Em média, a saliva proveniente de participantes soronegativos para o HIV aumentou a produção de CCL20 em $36,14 \pm 12,22$ vezes em relação às células não tratadas e a saliva

proveniente de participantes soropositivos aumentou a produção de CCL20 em $39,46 \pm 14,43$ vezes. Embora sem diferença entre a estimulação provocada pelos participantes soronegativos e soropositivos para o HIV, ambos elevaram muito as taxas de produção de CCL20 pelas células HEC-1A em relação às células não tratadas. Assim, pode-se concluir que, *in vitro*, a saliva pôde estimular a produção de CCL20 pelas células HEC-1A, independentemente de ser ou não proveniente de participante infectado pelo HIV. Como a CCL20 é uma citocina responsável pela quimioatração de células dentríticas, dentre elas as células de Langerhans, sua estimulação pode aumentar a concentração de células alvo para o HIV, o que facilitaria a infecção pelo HIV.

Não apenas o HIV presente na saliva teria sua entrada facilitada, mas também a saliva poderia tornar a mucosa genital feminina um meio mais propício para a penetração do HIV presente no sangue ou no sêmen, que entraria em contato com a mucosa vaginal em uma posterior relação sexual heterossexual. Portanto, a lubrificação por meio da saliva, pode atuar como um facilitador da penetração do HIV pela mucosa genital feminina.

Não se observou diferenças entre as estimulações da produção de CCL20 pelas células HEC-1A e condição periodontal dos participantes. Entre os participantes soronegativos para o HIV que apresentavam boa saúde oral, a estimulação da produção de CCL20 foi de $34,58 \pm 13,6$ vezes em relação às células não tratadas; já dentre os participantes com gengivite, a estimulação foi $40,06 \pm 12,4$ vezes e entre os participantes com periodontite, $32,59 \pm 6,6$ vezes. Dentre os participantes soropositivos para o HIV que apresentavam boa condição oral, a estimulação da produção de CCL20 foi de $42,39 \pm 15,54$ vezes e dentre os participantes com gengivite e periodontite foi de $35,40 \pm 9,1$ e $44,17 \pm 21,24$ vezes, respectivamente.

Embora não se verificou relação entre a condição oral e a estimulação da produção de CCL20 pelas células HEC-1A, todas as amostras de plasmas salivares elevaram a produção de CCL20. Portanto, a saliva proveniente de participantes com boa condição oral, onde se presume uma menor concentração de citocinas pró-inflamatórias, foi tão capaz de estimular a produção de CCL20 quanto à saliva proveniente de participantes com infecção oral (gengivite ou periodontite). Isso leva à hipótese de que a estimulação de CCL20 pelas células HEC-1A pode ser verificada em salivas com baixas concentrações de citocinas pró-inflamatórias ou essa estimulação não está relacionada à presença de citocina pró-inflamatória, podendo ser outro fator, ainda não elucidado, o responsável pelo aumento na secreção de CCL20 pelas células HEC-1A.

A saliva total é composta de diversas substâncias, produzidas por diferentes glândulas salivares, restos alimentares, produtos bacterianos e fúngicos da flora oral. E pode ser que

algumas dessas substâncias, não abrangidas pelo presente estudo, sejam as responsáveis pela estimulação da produção de CCL20.

A Lf é armazenada em grânulos específicos dos granulócitos e é liberada em situações de quimiotaxia e adesão desses granulócitos. A Lf tem sido proposta como um importante marcador de granulócitos (OZEDEMIR et AL., 2009) e também possui papel importante na inibição da adesão de bactérias ao biofilme dental (PIERCE; LEGRAND; MAZURIER, 2009).

A Lf é uma proteína que têm como principal função a de quelar ferro do meio onde esteja presente, fazendo com que a deficiência de ferro iniba o crescimento bacteriano. A Lf também possui uma atividade antiviral contra o HIV (KAZMI et al., 2006), porém, peptídeos de clivagem da Lf apresentam efeitos pró-inflamatórios, em especial, o peptídeo G-12-I. A fim de verificarmos se a Lf pôde ter relação com a produção de CCL20 pelas células HEC-1A estimuladas com saliva, realizou-se a dosagem por ELISA da Lf de todos os plasmas salivares utilizados no estudo.

A Lf se relacionou à condição periodontal dos participantes soronegativos e soropositivos para o HIV, estando em menores concentrações naqueles pacientes que apresentavam condições periodontais saudáveis, e em maiores concentrações naqueles que apresentavam inflamação periodontal, representada pela gengivite ou pela periodontite. No entanto, não se verificou qualquer relação entre a concentração de Lf e produção de CCL20 pelas células HEC-1A estimuladas com saliva. Despendeu-se muito esforço para dosar o peptídeo G-12-I na saliva a fim de relacionarmos a concentração do peptídeo de clivagem da lactoferrina (G-12-I). Metodologicamente tal dosagem não foi possível, o que forçou a opção pelo estudo utilizando-se o Western blot com as amostras de saliva que mais e que menos induziram a produção de CCL20 pelas células HEC-1A. A amostra de saliva que menos estimulou a secreção de CCL20 pelas células HEC-1A, foi responsável por um aumento dessa estimulação na ordem de 20 vezes em relação às células não tratadas, e, portanto, mesmo que de forma inconclusiva, todas as amostras apresentaram a presença do peptídeo G-12-I nas mesmas proporções.

Os resultados do presente estudo corroboraram com resultados encontrados por Ozdemir et al. (2009), em estudo longitudinal em participantes submetidos a um modelo de gengivite experimental durante 14 dias. Naquele trabalho, verificou-se o aumento da Lf da secreção crevicular gengival, e da Lf no plasma sanguíneo durante a fase de gengivite experimental, voltando ao seu nível de normalidade quando a higiene oral foi reinstituída, após 21 dias. Outros estudos têm indicado que a Lf presente no fluido crevicular está

correlacionada à severidade da doença periodontal e com o aumento do número de leucócitos polimorfonucleares (ADONOGIANAKI; MOUGHAL; KINANE, 1993). Decréscimos dos níveis da Lf na saliva também foram verificados após o tratamento periodontal por Adonogianaki; Moughal e Kinane (1993).

A Lf não é sintetizada em tecidos gengivais saudáveis, estando associada a tecidos inflamados com presença de células inflamatórias. A Lf pode ser considerada um excelente marcador da doença periodontal, já que é secretada por neutrófilos em resposta à condição inflamatória (WAKABAYASHI et al, 2010).

A liberdade sexual promovida nas décadas de 60, 70 e 80 aumentou a prática de sexo oral (EDWARDS; CARNE, 1998). O estudo da transmissão do HIV pelo sexo oral é de difícil execução, pois, na maioria dos casos os pacientes infectados pelo HIV estiveram em contato com outras formas de relações sexuais, que não exclusivamente o sexo oral.

Em 1994, De Vincenzi realizou estudo longitudinal por dois anos, envolvendo 50 casais heterossexuais sorodiscordantes para o HIV, que praticavam sexo vaginal e sexo anal com uso de preservativo, e que, no entanto, assumiam a prática de sexo oral de forma desprotegida. Ao longo desse estudo, nenhuma soroconversão foi relatada.

Trabalho semelhante foi conduzido, em 2002, por Del Romero et al. observando 263 casais sorodiscordantes para HIV durante um período de dez anos. Eles praticavam sexo vaginal e anal com uso de preservativo e praticavam sexo oral sem qualquer proteção. Nesse trabalho também não se observou nenhuma soroconversão. Nos dois trabalhos apresentados, o sexo oral não apresentou risco em relação à infecção pelo HIV, no entanto, no presente trabalho ficou demonstrado que a saliva em contato com a mucosa endocervical pode promover a produção de CCL20, a qual é responsável pela quimiotaxia de células de Langerhans, aumentando assim as chances de transmissão pelo HIV.

O HIV está presente nas glândulas salivares e saliva, no entanto, existem muitas controvérsias sobre sua infectibilidade. Teoricamente, o trauma oral, tratamento dentário, ulceração e as condições inflamatórias podem aumentar a concentração de HIV na saliva (CAMPO et al, 2006). A presença de herpes-vírus é sabidamente modulatória para a replicação do HIV e a presença do Herpes Vírus Humano tipo 8 (HHV-8) provoca aumento significativo de HIV *in vitro* e *in vivo* (MERCADER; NICKOLOFF; FOREMAN, 2001), entretanto, sabe-se que a presença do HIV na saliva não é determinante para sua transmissão. Doenças como a hepatite C e a hepatite B apresentam riscos mais elevados, em relação à sua infectibilidade pela saliva do que quando comparado ao HIV (FABRIS et al. 1999, SONIS; FAZIO; FANG, 1996).

Desde o início da infecção pelo HIV é sabido que a saliva apresenta propriedades inibidoras do HIV (MALAMUD et al., 1997). Anticorpos IgA presentes na saliva agem diretamente contra as glicoproteínas *env* do HIV, especificamente na região V4 da *gp* 160 (SKOTT et al, 2002). SLPI, proteína presente em abundância na saliva, inibe a fusão do HIV às células hospedeiras e a depleção do SLPI reduz a atividade anti-HIV da saliva (CAMPO et al, 2006).

Fatores de defesa contra o HIV são amplamente conhecidos na saliva, no entanto os resultados do presente trabalho apontam que a saliva pode criar um meio propício para a entrada do HIV no epitélio endocervical, por meio do aumento da concentração de CCL20. Esse meio poderia ser aproveitado pelo HIV presente no plasma seminal, em uma posterior relação heterossexual sem o uso de preservativo ou até mesmo pelo HIV proveniente de microsangramentos durante esse ato sexual. Outros trabalhos descrevem riscos adicionais ao uso da saliva como lubrificante sexual. Em 2004, Tomás et al. relataram que a presença de peróxido de hidrogênio na mucosa vaginal produzida por microorganismos da família dos lactobacilos, que são microorganismos comumente encontrados na cavidade oral, são responsáveis por um desequilíbrio da flora normal da mucosa vaginal. A ausência de microorganismos da flora normal é capaz de aumentar os riscos de vaginose e infecções recorrentes no trato urinário por *Escherichia coli*, aumentando assim os riscos de infecção pelo HIV.

Em 2006, Campo et al. relataram que o sexo oral ativo oferece maiores riscos de contágio do HIV do que o sexo oral passivo, devido a possível presença de aftas, erosões, úlceras e processos inflamatórios na cavidade oral. No presente trabalho, por consequência, mostrou que os riscos do sexo oral passivo podem ser maiores do que o acreditado anteriormente, já que esse pode tornar a mucosa vaginal mais permissiva à entrada do HIV presente no sêmen ou sangue, por aumentar as concentrações de células de Langerhans através do aumento das concentrações de CCL20.

Não se verificou qualquer alteração sobre a capacidade da cultura de células HEC-1A secretarem CCL20 após estimulação com o conteúdo vaginal, coletado de participantes soropositivas e soronegativas para o HIV. Provavelmente, tais resultados se devem ao fato de terem sido selecionadas apenas participantes sem presença de vaginose, e que, portanto, apresentavam menores concentrações de citocinas pró-inflamatórias responsáveis pela ativação da produção de CCL20 pelas células HEC-1A.

Verificou-se também maiores concentrações de Lf entre os conteúdos vaginais de participantes soropositivas para o HIV. Em 2007, Novak et al. em estudo com pacientes

soronegativas para o HIV, classificadas como de baixo e de alto risco para a infecção para o HIV, verificaram maiores concentrações de Lf na secreção cervico-vaginal daquelas com maiores riscos de infecção pelo HIV, estando a Lf intimamente relacionada à presença de leucócitos na secreção cervico-vaginal. Esses autores também relacionaram a concentração de Lf com a presença de vaginose bacteriana. A presença de maiores concentrações de Lf no conteúdo vaginais das participantes soropositivas para o HIV, no presente estudo, se deu exclusivamente pela infecção pelo HIV, já que nenhum outro fator discordante esteve presente nos grupos estudados.

Estudos têm apontado a vaginose bacteriana como um fator de risco para o HIV (NOVAK et al., 2007), sugerindo que a atividade antiviral presente na lactoferrina não é o suficiente para combater o risco provocado por ela. O meio vaginal é complexo e qualquer efeito que a Lf possa ter sobre a transmissão do HIV deve ser considerado no contexto multifatorial do processo em estão envolvidos (NOVAK et al., 2007).

Acreditamos que os resultados do presente estudo contribuíram para melhor compreensão da entrada pelo HIV pela mucosa genital feminina, especialmente em relação ao estudo com plasma seminal, o qual apresentou fatores que contribuíram para o aumento da produção de CCL20 pelas células epiteliais endocervicais. Contribui também para o melhor entendimento dos riscos do sexo oral passivo e do uso da saliva como lubrificante oral, já que a saliva foi responsável pelo aumento expressivo da produção de CCL20 pelas células epiteliais endocervicais.

6 CONCLUSÕES

6.1 Quanto ao estudo do plasma seminal:

- Os plasmas seminais de participantes soropositivos e soronegativos para o HIV são capazes de estimular a produção de CCL20 pelas células HEC-1A;
- Os plasmas seminais de participantes soropositivos para o HIV foram responsáveis por maior estimulação da produção de CCL20 pelas células HEC-1A quando comparados aos plasmas seminais de participantes soronegativos;
- Maiores concentrações de Lf foram encontradas em plasmas seminais de participantes soropositivos para o HIV;
- Maiores concentrações de proteínas totais foram observadas em plasmas seminais de participantes soronegativos para o HIV;
- Não se verificou correlação entre proteínas totais dos plasmas seminais e sua capacidade de estimular a produção de CCL20 pelas células HEC-1A;
- Não se verificou correlação entre a carga viral dos plasmas seminais e sua capacidade de estimular a produção de CCL20 pelas células HEC-1A;
- Observou-se correlação entre a concentração de Lf e a estimulação da produção de CCL20 pelas células HEC-1A estimuladas com plasmas seminais de participantes soropositivos e soronegativos para o HIV; e,
- Frações de plasmas seminais de participantes soronegativos para o HIV que apresentaram maiores concentração de Lf foram responsáveis pelo aumento na produção de CCL20 pelas células HEC-1A.

6.2 Quanto ao estudo da saliva:

- Amostras de plasmas salivares de participantes soropositivos e soronegativos para o HIV foram responsáveis por aumento na estimulação da produção de CCL20 pelas células HEC-1A;
- Não se observou diferenças de produção de CCL20 pelas células HEC-1A estimuladas com plasma salivar de participante soropositivo ou soronegativo para o HIV;

- A produção de CCL20 pelas células HEC-1A estimuladas com plasma salivar não se correlacionou à saúde periodontal dos participantes;
- A concentração de Lf foi maior nos participantes que apresentaram alguma inflamação periodontal (gingivite ou periodontite) quando comparada aos participantes com uma adequada saúde periodontal, tanto nos participantes soronegativos quanto nos participantes soropositivos para o HIV;
- Não se observou qualquer correlação entre a concentração de Lf salivar e sua capacidade de induzir a produção de CCL20 pelas células HEC-1A; e,
- Não se observou diferenças entre as bandas de peptídeo G-12-I presentes na saliva de participantes soropositivos que mais e que menos induziram a produção de CCL20 pelas células HEC-1A.

6.3 Quanto ao estudo do conteúdo vaginal:

- Os conteúdos vaginais de participantes soronegativas ou soropositivas para o HIV não estimularam a produção de CCL20 pelas células HEC-1A;
- A Lf esteve em maiores concentrações nas amostras do conteúdo vaginal de participantes soropositivas para o HIV.

REFERÊNCIAS

ABIKO, Y.; NISHIMURA, M.; KUSANO, K.; NAKASHIMA, K.; OKUMURA, K.; ARAKAWA, T.; TAKUMA, T.; MIZOGUCHI, I.; KAKU, T. Expression of MIP-3 α /CCL20, a macrophage inflammatory protein in oral squamous cell carcinoma. **Arch Oral Biol**, Oxford, v. 48, p. 171–175, 2003.

ACTOR, J.K.; HWANG, S.A.; KRUZEL, M.L. Lactoferrin as a natural immune modulator. **Curr Pharm Des**, Schiphol, v. 15, n. 17, p. 1956–1973, 2009.

ADACHI, A.; KOENING, S.; GENDELMAN, H.E.; DAUGHERTY, D.; GATTONI-CELLI, A.S.; FAUCI, A.S.; MARTIN, M.A. Productive, persistent infection of human colorectal cell lines with human immunodeficiency virus. **J Virol**, Baltimore, v. 61, p. 209-213, 1987.

ADONOGIANAKI, E.; MOUGHAL, N.A.; KINANE, D.F. Lactoferrin in the gingival crevice as a marker of polymorphonuclear leucocytes in periodontal diseases. **J Clin Periodontol**, Copenhagen, v. 20, p. 26–31, 1993.

ALFSEN, A.; BOMSEL, M. HIV-1 gp41 envelope residues 650-685 exposed on native virus act as a lectin to bind epithelial cell galactosyl ceramide. **J Biol Chem**, San Francisco v. 277, p. 25649-25659, 2002.

ALFSEN, A.; INIGUEZ, P.; BOUGUYON, E.; BOMSEL, M. Secretory IgA specific for a conserved epitope on gp41 envelope glycoprotein inhibits epithelial transcytosis of HIV-1. **J Immunol**, Baltimore, v. 166, p. 6257-6265, 2001.

ALFSEN, A.; YU, H.; MAGÉRUS-CHATINET, A.; SCHIMITT, A.; BOMSEL, M. HIV-1-infected blood mononuclear cells form an integrin- and agrin-dependent viral synapse to induce efficient HIV-1 transcytosis across epithelial cell monolayer. **Mol Biol Cell**, Bethesda, v. 16, p. 4267-4279, 2005.

AMATO, V.N.; MEDEIROS, E.A.S.; KALLÁS, E.G.; LEVI, G.C.; BALDY, J.L.S.; MEDEIROS, R.S.S. Etiologia. In _____ **AIDS na prática médica**. São Paulo: Sarvier, 1996, cap. 2, p. 2-7.

APODACA, G. Endocytic traffic in polarized epithelial cells: role of the actin and microtubule cytoskeleton. **Traffic**, Copenhagen, v. 2, p. 149-159, 2001.

* De acordo com

Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR.6023**: informação e documentação: referência: elaboração. Rio de Janeiro 2002

BABA, M.; IMAI, T.; NISHIMURA, M.; KAKIZAKI, M.; TAKAGI, S.; HIESHIMA, K.; NOMIYAMA, H.; YOSHIE, O. Identification of CCR6, the specific receptor for a novel lymphocyte-directed CC chemokine LARC. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 272, n. 23, p.14893–14898, 1997.

BARRE-SINOUSSE, F. HIV as the cause of AIDS. **Lancet**, London, v. 348, n. 9019, p. 31-35, 1996.

BARRE-SINOUSSE, F. HIV target cells: effect of their infection by HIV on the pathogenesis of AIDS. **Lymphology**, Stuttgart, v. 21, p. 11-14, 1988.

BARRE-SINOUSSE, F.; CHERMANN, J.C.; REY, F.; NUGEYRE, M.T.; CHAMARET, S.; GRUEST, J.; DOUGHET, C.; AXLER-BLIN, C.; VEZINET-BRUN, F.; ROUZIOUX, C.; ROZENBAUM, W.; MONTAGNIER, L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Science**, New York, v. 220, n. 4599, p. 868-871, 1983.

BATTES, P. Chemokine receptors and HIV-1: an attractive pair? **Cell**, v. 86, p. 1-3, 1996.

BELL, D. M. Occupational risk of human immunodeficiency virus infection in healthcare workers: an overview. **Am J Med**, Philadelphia, v. 102 n. 5B, p. 9-15, 1997.

BERLIER, W.; CREMEL, M.; HAMZE, H.; LÉVY, R.; LUCHT, F.; BOURLET, T.; POZZETTO, B.; DELÉZAY, O. Seminal plasma promotes the attraction of langerhans cells via the secretion of CCL20 by vaginal epithelial cells: involvement in the sexual transmission of HIV. **Hum Reprod**, Oxford, v. 21, p. 1135-1142, 2006.

BERKHOUT, B. Lactoferrin prevents dendritic cell-mediated human immunodeficiency virus type 1 transmission by blocking the DC-SIGN-gp120 interaction. **J Virol**, Washington, v. 79, p. 3009-15, 2005.

BHOOPAT, L.; EIANGLING, L.; RUGPAO, S.; FRANKEL, S.S.; WEISSMAN, D.; LEKAWANVIJIT, S.; PETCHJOM, S.; THORNER, P.; BHOOPAT, T. In vivo identification of langerhans and related dendritic cells infected with HIV-1 subtype e in vaginal mucosa of asymptomatic patients. **Mod Pathol**, Baltimore, v. 14, p. 1263-1269, 2001.

BJERCKE, S.; SCOTT, H.; BRAATHEN, L.R.; THORSBY, E. Hla-dr-expressing Langerhans'-like cells in vaginal and cervical epithelium. **Acta Obstet Gynecol Scand**, Copenhagen, v. 62, p. 585-589, 1983.

BOCK, P.J.; MARKAVITZ, D.M. Infection with HIV-2. **AIDS**, London, v. 15, p. 35-45, 2001.

BOMSEL, M. Transcytosis of infectious human immunodeficiency virus across a tight human epithelial cell line barrier. **Nat Med**, New York, v. 3, p. 42-47, 1997.

BRAATHEN, L.R. Langerhans cells and HIV infection. **Biomed Pharmacother**, New York, v. 42, p. 305-308, 1988

BRAATHEN, L.R.; RAMIREZ, G.; KUNZE, O.; GELDERBLOM, H. Langerhans cells as primary target cells for HIV infection. **Lancet**, London, v. 2, n. 8567, p. 1094, 1987.

BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim epidemiológico AIDS/DST de janeiro a julho de 2008**; disponível em <http://www.aids.gov.br>. Acesso em 10 de fevereiro de 2010.

BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Plano Operacional – Redução da Transmissão Vertical do HIV e da Sífilis – Brasil, 2007**. Disponível em <http://sistemas.aids.gov.br/feminizacao>. Acesso em 23 de março de 2011.

BROGI, A.; PRESENTINI, R.; SOLAZZO, D.; PIOMBONI, P.; COSTANTINO-CECCARINI, E. Interaction of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp120 with a galactoglycerolipid associated with human sperm. **AIDS Res Hum Retroviruses**, New York, v. 12, p. 483-489, 1996.

CAMPO, J.; PEREA, M.A.; DEL ROMERO, J.; CANO, J.; HERNANDO, V.; BASCONES, A. Oral transmission of HIV, reality or fiction? An update. **Oral Dis**, Copenhagen, v. 12, p. 219–228, 2006.

CARR, J.M.; HOCKING, H.; LI, P.; BURRELL, J.C. Rapid and efficient cell-to-cell transmission of human immunodeficiency virus infection from monocyte-derived macrophages to peripheral blood lymphocytes. **Virology**, New York, v. 265, p. 319-329, 1999.

CARRENO, M.; KRIEFF, C.; IRINOPOULOU, T.; KAZATCHKINE, M. D; BELEC, L. Enhanced transcytosis of R5-tropic human immunodeficiency virus across tight monolayer of polarized human endometrial cells under pro-inflammatory conditions. **Cytokine**, San Diego, v. 20, p. 289-294, 2002.

CASTILHO, E.A.; CHEQUER, P. A epidemia da AIDS no Brasil. In: Coordenação Nacional de DST e AIDS. **A epidemia da AIDS no Brasil, situação e tendências**. Brasil - Ministério da Saúde, Brasília 1997, p. 9-12.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTIONS (CDC) – Current Trend Update on Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) – United States. **MMWR**, Atlanta, v. 31 n. 37, p. 507-508, 513-514, 1982.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL E PREVENTION (CDC). Revised classification system for HIV infectious and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. **MMWR**, Atlanta, v. 41, p. 1-19, 1993.

CHANCEY, C.J.; KHANNA, K.V.; SEEGER, J.F.M.L.; ZHANG, G.W.; HILDRETH, J.; LANGAN, A.; MARKHAM, R.B. Lactobacilli expressed single-chain variable fragment (scfv) specific for intercellular adhesion molecule 1 (icam-1) blocks cell-associated HIV-1 transmission across a cervical epithelial monolayer. **J Immunol**, Baltimore, v. 176, p. 5627-5636, 2006.

CHARBONNIER A.S.; KOHRGRUBER, N.; KRIEHLER, E.; STINGL, G.; ROT, A.; MAURER, D. Macrophage inflammatory protein 3 α is involved in the constitutive trafficking of epidermal langerhans cells. **J Exp Med**, New York, v. 190, p. 1755–1768, 1999.

CHIRIBOGA, C.D.R. Mujer y SIDA conceptos sobre el tema. In: RICON B, VANDALE S, ALLEN B, LIGUORI AL. **Situacion de las mujeres y el VIH/SIDA en America Latina**. México: Instituto Nacional Salud Pública, 1997.

CHOE, H.; FARZAN, M.; SUN, N.; SULLIVA, N.; ROLLINS, B.; PONATH, D.; WU, L.; MACKAY, C.R.; LAROSA G.; NEWMAN, W.; GERARD, N.; GERARD C.; SODROSKI, J. The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. **Cell**, Cambridge, v. 85, p. 1135-1148, 1996.

CHUN, T.W.; CARRUTH, L.; FINZI, D.; XUEFEI, S.; DIGISEPPE, J.A.; TAYLOR, H.; HERMANKOVA, M.; CHADWICK, R.; MARGOLICK, J.; QUINN, T.C.; KUO, Y.H.; BROOKMEYER, R.; ZEIGER M.A.; BARDITCH-CROVO, P.; SICILIANO, R.F. Quantification of latent tissue reservoir and total body viral load in HIV-1 infection. **Nature**, London, v. 387, n. 6629, p. 183-188, 1997.

CIMERMAN, S.; LOMAR, A.V.; LEWI, D.S. Tratamento anti-retroviral em AIDS. In: CIMERMAN, S.; CIMERMAN, B. **Condutas em infectologia**, São Paulo: Atheneu, 2004, cap. 6.1, p. 55-62.

CLARK, S.S.; SAAG, M.S.; DECKER, W.D.; CAMPBELL, S.; ROBERSON, J.C.; VELDKAMP, P.J.; KAPPES, J.C.; HAHN, B.H.; SHAW, G.W. High titer of cytopathic virus in plasma of patients with symptomatic primary HIV-1 infection. **N Engl J Med**, Boston, v. 324, n. 14, p. 954-960, 1991.

CLAVEL, F.; GUÉTARD, F.; BRUN-VÉZINET, F.; CHAMARET, S.; REY M.A.; SANTOS-FERREIRA, M.O.; LAURENT, A.G.; DAUGUET, C.; KATLAMA C.; ROUZIOUX, C., et al. Isolation of a new human retrovirus from west African patients with AIDS. **Science**, New York, v. 223, p. 343-346, 1986.

COFFIN, F.; HAASE, A.; LEVY, J.A.; MONTAGNIER, L.; OROSZLAN, S.; TEICH, N. ; TOYOSHIMA, K.; VARMUS, P.; VOGT, P. et al. What to call the AIDS virus? **Nature**, London, v. 321, p. 10, 1986.

COHN, E.S.; CLARK, R.A. Sexually transmitted disease, HIV and AIDS in women. **Med Clin N Am**, Philadelphia, v. 87, p. 971-995, 2003.

COOVADIA, H. Antiretroviral agents—how best to protect infants from HIV and save their mothers from AIDS. **N Engl J Med**, London, v. 351, n. 3, p. 289-292, 2004

CREMEL, M.; BERLIER, W.; HAMZEH, H.; COGNASSE, F.; LAWRENCE, P.; GENIN, C.; BERNENGO, J.C.; LAMBERT, C.; DIEU-NOSJEAN, M.C.; DELÉZAY, O. Characterization of CCL20 secretion by human epithelial vaginal cells: involvement in Langerhans cell precursor attraction. **J Leukoc Biol**, New York, v. 78, p. 158–166, 2005.

CRITTENDEN, J.A.; HANDELSMAN, D.J.; STEWART, G.J. Semen analysis in human immunodeficiency virus infection. **Fertil Steril**, New York, v. 57, n. 6, p.1294-9, 1992.

De VINCENZI, I. A longitudinal study of human immunodeficiency virus transmission by heterosexual partners. **N Engl J Med**, Boston, v. 331, p. 341–346, 1994.

DE WITTE, L.; NABATOV, A.; GEIJTENBEEK, T.B. Distinct roles for DC-SIGN+-dendritic cells and Langerhans cells in HIV-1 transmission. **Trends Mol Med**, Oxford, v. 14, p. 12-19, 2007.

DEFER, M.C.; DUGAS, B.; PICARD, O.; DAMAIS, C. Impairment of circulating lactoferrin in HIV-infection, **Cell Mol Biol**, Noisy-le-Grand, v. 41, p. 417-421, 1995.

DEL ROMERO, J.; MARINCOVICH, B.; CASTILLA, J.; GARCÍA, S.; CAMPO, J.; HERNANDO, V.; RODRÍGUEZ, C. Evaluating the risk of HIV transmission through unprotected orogenital sex. **AIDS**, London, v. 16, p. 1296–1297, 2002.

DENISON, F.C.; GRANT, V.E.; CALDER, A.A.; KELLY, R.W. Seminal plasma components stimulate interleukin-8 and interleukin-10 release. **Mol Hum Reprod**, Oxford, v. 5, p. 220–226, 1999.

DEZZUTTI, C.S.; GUENTHNER, P.C.; CUMMINS, J.E.J.; CABRERA, T.; MARSHALL, J.H.; DILLBERGER, A.; LAL, R.B. Cervical and prostate primary epithelial cells are not productively infected but sequester human immunodeficiency virus type 1. **J Infect Dis**, Oxford, v. 183, p. 1204-1213, 2001.

DI STEFANO, M.; FAVIA, A.; MONNO, L.; LOPALCO, P.; CAPUTI, O.; SCARDIGNO, A.C.; PASTORE, G.; FIORE, J.R.; ANGARANO, G. Intracellular and cell-free (infectious) HIV-1 in rectal mucosa. **J Med Virol**, New York, v. 65, p. 637-643, 2001.

DIEU-NOSJEAN, M.C.; MASSACRIER, C.; HOMEY, B.; VANBERVLIET, B.; PIN, J.J.; VICARI, A.; LEBECQUE, S.; DEZUTTER-DAMBUYANT, C.; SCHMITT, D.; ZLOTNIK, A. CAUX, C. Macrophage inflammatory protein 3 α is expressed at inflamed epithelial surfaces and is the most potent chemokine known in attracting Langerhans cell precursors. **J Exp Med**, New York, v. 192, p. 705–718, 2000.

DOMS, R.W. Chemokine receptors and HIV entry. **AIDS**, London v. 15, p. S34-S35, 2001.

DONCEL, G.F.; JOSEPH, T.; THURMAN, A.R. Role of Semen in HIV-1 Transmission: Inhibitor or facilitator? **Am J Reprod Immunol**, New York, n. 65, p. 292–301, 2011.

DORE, G.J.; COOPER, D.A.; Classification and Spectrum. In MANDELL, G.L. **Atlas of infectious disease**. 2 ed., Philadelphia: Current Medicine, 1997, v. 1, chapter 4, p. 4.2-4.4.

DUNSHE, A.; AÇIL, Y.; SIEBERT, R.; HARDER, J.; SCHRÖDER, J.-.; JEPSEN, S. – Expression profile of human defensin and antimicrobial proteins in oral tissues. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v. 30, p. 154-158, 2001.

DUSSERRE, N.C.; DEZUTTER-DAMBUYANT, C.; MALLET, F.; DELORME, P.; PHILIT, F.; EBERSOLD, C.; DESGRANGES, C.; THIVOLET, J.; SCHMITT, D. In vitro HIV-1 entry and replication in langerhans cells may clarify the HIV-1 genome detection by pcr in epidermis of seropositive patients. **J Invest Dermatol**, Baltimore, v. 99, p. 99S-102S, 1992.

EC-CLEARINGHOUSE ON ORAL PROBLEMS RELATED TO HIV INFECTIONS AND WHO COLLABORATING CENTRE ON ORAL MANIFESTATIONS OF THE IMMUNODEFICIENCY VIRUS. Classification and diagnostic criteria for oral lesions in HIV infection. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v. 22, p. 289-291, 1993.

EDWARDS, S.; CARNE, C. Oral sex and the transmission of viral STIs. **Sex Transm Inf**, London, v. 74, p. 6–10, 1998.

FABRIS, P.; INFANTOLINO, D.; BIASIN, M.R.; MARCHELLE, G.; VENZA, E.; TERRIBILE, WIEL MARIN, V.; BENEDETTI, P.; TOSITTI, G.; MANFRIN, V.; DE LALLA, F. High prevalence of HCV-RNA in the saliva cell fraction of patients with chronic hepatitis C but no evidence of HCV transmission among sexual partners. **Infection**, München, v. 27, p. 86–91, 1999.

FAN, H.; CONNER, R.; VILLARREAL, L. Virology and Human Immunodeficiency Virus. In: **The biology of AIDS**. 3^a ed. Boston: Jones and Bartlett Publishers, 1994. Cap. 4, p. 50-78.

FREED, E.O.; MARTINS, M.A; HIV and their replication. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. **Fields virology**. 4 ed. Philadelphia, 2001. v. 2, p. 1971-2042.

FOX, C.H.; KOTLER, D.; TIERNEY, A.; WILSON, C.S.; FAUCI, A.S. Detection of HIV RNA in the lamina propria of patients with AIDS and gastrointestinal disease. **J Infect Dis**, Oxford, v. 159, p. 467-471, 1989.

GALLO, L.; SLISKI, A.; WONG-STAAAL, F. Origin T-cell leukaemia-lymphoma virus. **Lancet**, London, v. 2, p. 962-963, 1983.

GALLO, R.C.; MONTAGNIER, L. The discovery of HIV as the cause of AIDS. **N Engl J Med**, London, v. 349, p. 2283-2285, 2003.

GALLO, R.C.; WONG-STAAAL, F.; MONTAGNIER, L.; HASELINE, W.A.; YOSHIDA, M. HIV/HTLV gene nomenclature. **Nature**, London, v. 333, p. 504, 1988.

GLINA, S.; VIEIRA M. Aspectos básicos do espermograma. In: NARDOZZA A.J.; DOS REIS, R.B.; CAMPOS, R.S.M. **Manual de Urologia – Sociedade Brasileira de Urologia**, 2010. Cap. 2, p. 29-32.

GONZÁLEZ-CHÁVEZ, S.A.; ARÉVALO-GALLEGOS, S.; RASCÓN-CRUZ, Q. Lactoferrin: structure, function and applications. **Int J Antimicrob Agents**, Amsterdam, v. 33, n. 4, p. 301-308, 2009.

GOTTLIEB, M.S.; SCHROFF, R.; SCHANKER, H.M.; WEISMAN, J.D.; FAN, R.T.; WOLF, R.A.; SAXON A. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. **N Engl J Med**, Boston. v. 305, n. 24, p. 1425-31, 1981.

GRANDO, L.J.; YURGEL, L.S.; MACHADO, D.C.; SILVA, C.L.; MENEZES, M.; PIVOLLI, C. Oral manifestations, counts of CD-4+ T lymphocytes and viral load in Brazilian and American HIV-infected children. **Pesqui Odontol Bras**, São Paulo, v. 16, n. 1, p. 18-25, 2002.

GREENHEAD, P.; HAYES, P.S.; WATTS, P.S.; LAING K.G.; GRIFFIN, G.E.; SHATTOCK, R.J. Parameters of human immunodeficiency virus infection of human cervical tissue and inhibition by vaginal virucides. **J Virol**, Washington, v. 74, p. 5577-5586, 2000.

GROOT, F. GEIJTENBEEK, T.B.H.; SANDERS, R.W.; BALWIN, C.E.; SANCHEZ-HERNANDEZ, M.; FLORIS, R.; VAN KOOYK, Y.; DE JONG, E.C.; BERKHOUT, B. Lactoferrin prevents dendritic cell-mediated human immunodeficiency virus type 1 transmission by blocking the DC-SIGN-gp120 interaction. **J Virol**, Washington, v. 79, p. 3009-15, 2005.

GUATELLI, J.C.; SILICIANO, R.F.; KURITZKES, D.R.; RICHMAN, D.D. Human Immunodeficiency Virus. In RICHMAN DD, WHITLEY RJ, HAYDEN FG. **Clinical Virology**. 2^a ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002, cap. 2, p.685-729.

GUIMARÃES, M.D.; VLAHOV, D.; CASTILHO E.A. Postcoital vaginal bleeding as a risk factor for transmission of the human immunodeficiency virus in a heterosexual partner study in Brazil, Rio de Janeiro heterosexual study group. **Arch Intern Med**, Chicago, v. 157, p. 1362-1368, 1997.

GÜNTARD, H.F.; HAVLIR, D.V.; FISCUS, S.; ZHANG, Z. Q.; ERON, J.; MELLORS, J.; GULICK, R.; FROST, S.D.; BROWN, W.; SCHLEIF, W.; VALENTINE, F.; JONAS, L.; MEIBOHM, A.; IGNACIO, C.C.; ISSACS, R.; GAMAGAMI, E.; EMINI, E.; HAASE, A.; RICHMAN, D.D.; WONG, J.K. Residual human immunodeficiency virus (HIV) type 1 RNA and DNA in lymph nodes and HIV RNA in genital secretions and in cerebrospinal fluid after suppression of viremia for 2 years. **J Infect Dis**, Oxford, v. 183, p. 1318-1327, 2001.

GUPTA, P.; COLLINS, K.B.; RATNER, D.; WATKINS, S.; NAUS, G.J.; LANDERS, D.V.; PATTERSON, B.K. Memory CD4(+) T cells are the earliest detectable human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) – infected cells in the female genital mucosal tissue during HIV-1 transmission in an organ culture system. **J Virol**, Washington, v. 76, p. 9868-9876, 2002.

GURTLER, L. Difficulties and strategies of HIV diagnosis. **Lancet**, London, v. 348, n. 9021, p. 176-179, Jul 1996.

GUTSCHE, S.; VON WOLFF, M.; STROWITZKI, T.; THALER, C.J. Seminal plasma induces mRNA expression of IL-1beta, IL-6 and LIF in endometrial epithelial cells in vitro. **Mol Hum Reprod**, Oxford, v. 9, p. 785–791, 2003.

HARMSSEN, M.C.; SWART, P.J.; DE BETHUNE, M.P.; PAUWELS, R.; DE CLERCQ, E.; THE, T.H.; MEIJER, D.K. Antiviral effects of plasma and milk proteins: lactoferrin shows potent activity against both human immunodeficiency virus and human cytomegalovirus replication *in vitro*. **J Infect Dis**, Oxford v. 172, p. 380-88, 1995.

HASSAN, W.M.; LAVREYS, L.; CHOHAN, V.; RICHARDSON, B.A.; MANDALIYA, K.; NDINYA-ACHOLA, J.O.; KIARIE, J.; JAOKO, W.; HOLMES, K.K.; MCCLELLAND, R.S. Associations between intravaginal practices and bacterial vaginosis in Kenyan female sex workers without symptoms of vaginal infections. **Sex Transm Dis**, Philadelphia, v. 34, n. 6, p. 384-8, 2007

HAZRATI, E.; GALEN, B.; LU, W.; WANG, W.; OUYANG, Y.; KELLER, M.J.; LEHRER, R.I.; HEROLD, B.C. – Human α - and β -defensin block multiple steps in herpes simplex virus infection. **J Immunol**, Baltimore, v. 177, p. 8658-8666, 2006.

HEDGES, S. R.; AGACE, W.W.; SVANBORG, C. Epithelial cytokine responses and mucosal cytokine networks. **Trends Microbiol**, Cambridge, v. 3, p. 266-270, 1995.

HLADIK, F.; LENTZ, G.; AKRIDGE, R.E.; PETERSON, G.; KELLEY, H.; MCELROY A.; MCELROTH M.J. Dendritic cell-t-cell interactions support coreceptor-independent human immunodeficiency virus type-1 transmission in the genital tract. **J Virol**, Washington, v. 73, p. 5833-5842, 1999.

HOCINI, H.; BECQUART, P.; BOUHLAL, H.; CHOMONT, N.; ANCUTA, P.; KAZATCHKINE, M.D.; BÉLEC, L. A. Active and selective transcytosis of cell-free human immunodeficiency virus through a tight polarized monolayer of human endometrial cells. **J Virol**, Washington, v. 75, p. 5370-5374, 2001.

HOWELL, A.L.; EDKINS, R.D.; RIER, S.E.; YEAMAN, G.R.; STERN, J.E.; FANGER, M.W.; WIRA, C.R. Human immunodeficiency virus type 1 infections of cells and tissues from the upper and lower human female reproductive tract. **J Virol**, Washington, v. 71, p. 3498-3506, 1997.

JANA, N.K.; GRAY, L.R.; SHUGARS, D.C. – Human immunodeficiency virus type 1 stimulates the expression and production of secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) in oral epithelial cells: a role for SLPI in innate mucosal immunity. **J Virol**, Washington, v. 79, n. 10, p. 6432-6440, 2005.

JOHNSON, L.F.; LEWIS, D.A. The effect of genital tract infections on HIV-1 shedding in genital tract: a systematic review and meta-analysis. **Sex Transm Dis**, Philadelphia, v. 35, p. 946-959, 2008.

KALICHMAN, S.C.; DI BERTO, G.; BA, AND LISA EATON, MA. Human Immunodeficiency Virus Viral Load in Blood Plasma and Semen: Review and Implications of Empirical Findings, **Sex Transm Dis**, Philadelphia, v. 35, n. 1, p. 55–60, 2008.

KASER, A.; LUDWICZEK, O.; HOLZMANN, S.; MOSCHEN, A.R.; WEISS, G.; ENRICH, B.; GRAZIADEI, I.; DUNZENDORFER, S.; WIEDERMANN, C.J.; MÜRZL, E.; GRASL, E.; JASAREVIC, Z.; ROMANI, N.; OFFNER, F.A.; TILG, H. Increased expression of CCL20 in human inflammatory bowel disease. **J Clin Immunol**, New York, v. 24, p. 74–85, 2004.

KAZMI, S.H.; NAGLIK, J.R.; SWEET, S.P.; EVANS, R.W.; O'SHEA, S.; BANATVALA, J.E.; CHALLACOMBE, S.J. Comparison of human immunodeficiency virus type 1-specific inhibitory activities in saliva and other human mucosal fluids. **Clin Vac Immunol**, v. 13, p. 1111-18, 2006.

KIESSLING, A.A. HIV in semen. **JAMA**, Atlanta, v. 268, p. 2651-2652, 1992.

KLATZMAN, D.; BARRÉ-SINOUSSE, M.T.; NUGEYRE, C.; DANQUET, E. ; VILMER, C. ; GRISCELLI, F. ; BRUN-VEZIRET, C. ; ROUZIOUX, J.C. ; GLUCKMAN, J.C. ; CHERMANN, J.C. Selective tropism of lymphadenopathy associated virus (lav) for helper-inducer lymphocytes. **Science**, New York, v. 225, p. 59-63, 1984.

KOMINE, K.; KOMINE, Y.; KUROISHI, T.; KOBAYASHI, J.; OBARA, Y.; KUMAGAI, K. Small molecule lactoferrin with an inflammatory effect but no apparent antibacterial activity in mastitic mammary gland secretion. **J Vet Med Sci**, Tokyo, v. 67, p. 667-677, 2005.

KOMINE, K.; KUROISHI, T.; OZAWA, A.; KOMINE, Y.; MINAMI, T.; SHIMAUCHI, H.; SUGAWARA, S. Cleaved inflammatory lactoferrin peptides in parotid saliva of periodontitis patients. **Mol Immunol**, Oxford, v. 44, p. 1498-508, 2007.

LARSSON, M.; FONTENEAU, J.F.; LIRVALL, M.; HASLETT, P.; LIFSON, J.D.; BHORDWAJ, N. Activation of HIV-1 specific CD4 and CD8 T cells by humans dendritic cells: roles for cross-presentation and non-infectious HIV-1 virus. **AIDS**, London, v. 16, n. 10, p. 1319-1329, 2002.

LEHNER, T.; HUSSAIN, L.; WILSON, J.; CHAPMAND, M. Mucosal transmission of HIV. **Nature**, London, v. 353, p. 709, 1991.

LEVY, J.A. Fatores imunológicos e virais da infecção causada pelo HIV. In: Sande, M.A.; Volberding, P.A. **Tratamento clínico da AIDS**, London, 3^a ed. Rio de Janeiro: Revinter, 1995. p. 15-26.

LEVY, J.A. The pathogenesis of HIV infections. **Hosp Pract**, New York, v.25, n.11, p. 41-48, 1990.

LEVY, J.A.; HOFFMAN A.D.; KRAMER S.M.; LANDIS J.A.; SHIMABUKURO J.M.; OSHIRO L.S. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. **Science**, v. 225, p. 840-842, 1984.

LIUZZI, G.A.; CHIRIANNI, A.; CLEMENTI, M.; BAGNARELLI, P.; VALENZA, A.; CATALDO, P.T.; PIAZZA, M. Analysis of HIV load in blood, semen and saliva: evidence for different viral compartments. **AIDS**, London, v. 10, p. F51-F56, 2003.

LOCHRIE, M.A.; WAUGH, S.; PRATT, D.G.; CLEVER, J.; PARSLOW, T.G.; POLISK, B. In vitro selection of RNAs that bind to the Human Immunodeficiency Virus type-1 gag polypeptide. **Nucleic Acids Res**, Oxford, v. 25, n. 14, p. 2902-2910, 1997.

LÜ, F.X.; JACOBSON, R.S. – Oral mucosal immunity and HIV/SIV infection. **J Dent Res**, Chicago, v. 216, n. 3, p. 216-226, 2007.

MALAMUD, D.; NAGASHUNMUGAN, T.; KENNED, Y.S.; ABRAMS, W.R.; KREAM, R.; FRIEDMAN, H.M. Inhibition of HIV infectivity by human saliva. **Oral Dis**, Copenhagen, v. 3, Suppl 1, p. 558-563, 1997.

MARCELIN, A.; TUBIANA, R.; LAMBERT-NICLOT, S.; LEFEBVRE, G.; DOMINGUEZ, S.; BONMARCHAND, M.; VAUTHIER-BROUZES, D.; MARGUET, F.; MOUSSET-SIMEON, N.; PEYTAVIN, G.; POIROT, C. Detection of HIV-1 RNA in seminal plasma samples from treated patients with undetectable HIV-1 RNA in blood plasma. **AIDS**, London, v. 22, p. 1677-1679, 2008.

MAYER, K.H.; ANDERSON, D.J. Heterosexual HIV transmission. **Infect Agents Dis**, New York, v. 4, p. 273-284, 1995.

MCCLURE, C.P.; TIGHE P.J.; ROBINS, R.A.; BANSAL D.; BOWMAN, C.A.; KINGSTON, M.; BALL, J.K. HIV coreceptor and chemokine ligand gene expression in the male urethra and female cervix. **AIDS**, London v. 19, p. 1257-1265, 2005

MCDUGAL, J.S.; MADDON, P.J.; DALGLEISH, A.G.; CLAPHAM, P.R.; LITTMAN, R.; GODFREY, D.E.; MADDON, L.; CHESS, R.A.; WEISS, A.; AXEL, R. The T4 glycoprotein is a cell surface receptor for the AIDS virus. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, Cold Spring Harbor, v. 51, n. 2, p. 703-711, 1986.

MENG, G.; WEI, X.; WU, X.; SELLERS, M.T.; DECKER, J.M.; MOLDOVEANU, Z.; ORENSTEIN, J.M.; GRAHAM, M.F.; KAPPES, J.C.; MESTECKY, J.; SHAW, G.M.; SMITH, P.D. Primary intestinal epithelial cells selectively transfer R5 HIV-1 to CCR5+ cells. **Nat Med**, New York, v. 8, p. 150-156, 2002.

MERCADER, M.; NICKOLOFF, B.J.; FOREMAN, K.E. Induction of human immunodeficiency virus 1 replication by human herpesvirus 8. **Arch Pathol Lab Med**, Chicago, v. 125, p. 785– 789, 2001.

METROCA, C.E.; CUNNINGHAM-RUNDLES, S.; POLLACK, M.S.; SONNABEND, J.A.; DAVIS, J.M.; GORDON, B.; FERNANDES, R.D.; MOURADIAN, J. Generalized lymphadenopathy in homosexual men. **Ann Intern Med**, Philadelphia, v. 99, n. 5. p. 585-591, 1983.

MILLER, C.J. Localization of simian immunodeficiency virus-infected cells in the genital tract of male and female rhesus macaques. **J Reprod Immunol**, Amsterdam, v. 41, p. 331-339, 1998.

MILLER, C.J.; MCCHESENEY, M.; MOORE, P.F. Langerhans cells, macrophages and lymphocyte subsets in the cervix and vagina of rhesus macaques. **Lab Invest**, New York, v. 67, p. 628-634, 1992.

MILLER, C.R. Pediatric aspects of AIDS. **Adiol Clin North Am**, Philadelphia, v. 35, n. 5, p. 1191-1221, 1997.

MOHAMMEDI, H.; MAMOUZI, S.; ALLAL, C.; GHAFFOR, M.; RABHI, H.; ABBADI, M.C. Rapid and sensitive micromethod for protein determination by the Coomassie-blue technique, **Arch Inst Pasteur Alger**, Alger, v. 57, p. 151-62, 1989.

MORIZONO, K.; HARADA, S. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection and transcytosis activity of a HIV-1 susceptible clone from HeLa cell. **Microbiol Immunol**, Tokyo, v. 42, p. 313-320, 1998.

MORROW, G.; VACHOT, L.; VAGENAS, P.; ROBBIANAI, M. Current concepts of HIV transmission. **Curr Infect Dis Rep**, Philadelphia, v. 10, p. 133-139, 2008.

MÜNCH, J.; RÜCKER, E.; STÄNDKER, L.; ADERMANN, K.; GOFFINET, C.; SCHINDLER, M.; WILDUM, S.; CHINNADURAI, R.Ç RAJAN, D.; SPECHT, A.; GIMÉNEZ-GALLEGU, G.; CUEVAS SÁNCHEZ, P.; FOWLER, D.M.; KOULOV, A.; KELLY, J.W.; MOTHES, W.; GRIVEL, J.C.; MARGOLIS, L.; KEPLER, O.T.; FORSSMANN, W.G.; KIRCHHOFF, F. Semen-derived amyloid fibrils drastically enhance HIV infection. **Cell**, Cambridge, v. 131, p. 1059-1071, 2007.

MURATORI, C.; SISTIGU, A.; RUGGIERO, E.; FALCHI, M.; BACIGALUPO, I.; PALLADINO, C.; TOSCHI, E.; FEDERICO, M. Macrophages transmit human immunodeficiency virus type 1 products to CD4-negatives cells: involvement of matrix metalloproteinase 9. **J Virol**, Washington, v. 81, p. 9078-9087, 2007.

NAKAYAMA, T.; FUJISAWA, R.; YAMADA, H.; HORIKAWA, T.; KAWASAKI, H.; HIESHIMA, K.; IZAWA, D.; FUJIE, S.; TEZUKA, T.; YOSHIE, O. Inducible expression of a CC chemokine liver- and activation-regulated chemokine (LARC)/macrophage inflammatory protein (MIP)-3 alpha/CCL20 by epidermal keratinocytes and its role in atopic dermatitis. **Int Immunol**, Oxford, v. 13, p. 95-103, 2001.

NATIONAL INSTITUTE OF ALLERGY AND INFECTIOUS DISEASES (NIAID) How HIV Causes AIDS. **Basic Information about HIV disease and AIDS**, 2004. Disponível em: <http://www.aegis.com/topics/hivandaids.html>. Último acesso 10/03/2011

NAVAZESH, M. Methods for collecting saliva. **Ann N Y Acad Sci**, New York, v. 694, p. 72-77, 1993.

NG, T.B.; LAM, T.L.; AU, T.K.; YE, X.Y.; WAN, C.C. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase, protease and integrase by bovine milk proteins. **Life Sci**, Amsterdam, v. 69, p. 2217-23, 2001.

NORVELL, M.K.; BENRUBI, G.I.; THOMPSON, R.J. Investigation of microtrauma after sexual intercourse. **J Reprod Med**, Chicago, v. 29, p. 269-271, 1984.

NOVAK, R.M.; DONOVAL, B.A.; GRAHAM, P.J.; BOKSA, L.A.; SPEAR, G. HERSHOW, R.C.; CHEN, H.Y.; LANDAY, A. Cervicovaginal levels of lactoferrin, secretory leukocyte protease inhibitor, and RANTES and the effects of coexisting vaginoses in human immunodeficiency virus (HIV)-seronegative women with a high risk of heterosexual acquisition of HIV infection. **Clin Vaccine Immunol**, Washington, v. 14, n. 9, p. 1102-7, 2007.

NUNES, C.L.X.; GONÇALVES, L.A.; SILVA, P.T.; BINA, J.C. Clinical epidemiological characteristics of a group of HIV/AIDS infected women in Salvador–Bahia. **Rev Soc Brasil Med Trop**, Brasília, v.37, n.6, p.436-440, 2004.

O'BRIEN, T.R.; SHAFFER, N.; JAFFE, H.W. Transmissão e infecção do vírus do HIV. In: SANDE, M.A.; VOLBERDING P.A. **Tratamento clínico da AIDS**. 3^a ed. Rio de Janeiro: Revinter, 1995, cap.1, p.3-14.

OCHOA, T.J.; NOGUERA-OBENZA, M.; CLEARY, T.G. Lactoferrin blocks the initial host cell attachment mechanism of Enteropathogenic E. coli (EPEC). **Adv Exp Med Biol**, New York, v. 554, p. 463–6, 2004.

O'CONNOR, T.J.; KINCHINGTON, D.; KANGRO, H.O.; JEFFRIES, D.J. The activity of candidates virucidal agents, low ph and genital secretions against HIV-1 in vitro. **Int J STD AIDS**, London, v. 6, p. 267-272, 1995.

ONGRADI, J.; CECCHERINI-NELLI, L.; PISTELLO, M. ; SPECTER, S. ; BENDINELLI, M. Acid sensitivity of cell-free and cell-associated HIV-1 : clinical implications. **AIDS Res Hum Retroviruses**, New York, v. 6, p. 1433-1436, 1990.

O'SHAUGHNESSY MV, SCHETER MT. Learning about HIV-2. **Lancet**, London, v. 344, p. 1380-1381, 1994.

OZDEMIR, B.; OZCAN, G.; KARADUMAN, B.; TEOMAN, A.I.; AYHAN, E.; OZER, N.; US, D. Lactoferrin in Gingival Crevicular Fluid and Peripheral Blood during Experimental Gingivitis. **Eur J Dent**, Ankara, v. 3, n. 1, p. 16-23, 2009.

PAGANO, M.; GAUVREAU, K. **Princípios de Bioestatística**. São Paulo: Editora Thomson, 2004.

PARANJPE, S.; CRAIGO, J.; PATTERSON, B.; DING, M.; BARROSO, P.; HARRISON, L.; MONTELARO, R.; AND GUPTA, P. Subcompartmentalization of HIV-1 quasispecies between seminal cells and seminal plasma indicates their origin in distinct genital tissues. **AIDS Res Hum Retroviruses**, New York, v. 18, p. 1271-1280, 2002.

PHILLIPS, D.M. The role of cell-to-cell transmission in HIV infection. **AIDS**, London, v. 8, p. 719-731, 1994.

PIERCE, A.; LEGRAND, D.; MAZURIER, J. La lactoferrine : une protéine multifonctionnelle. **Med Sci (Paris)**, Paris, v. 25, n. 4, p. 361-369, 2009

PIGUET, V.; BLAUVELT, A. Essential roles for dendritic cells in the pathogenesis and potential treatment of HIV disease. **J Invest Dermatol**, Baltimore, v. 119, p. 365–369, 2002.

PINTO, A.J. **Comparação do perfil genético do Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1 em compartimentos sanguíneo e líquido de pacientes com afecções neurológicas**. 2007, 97f, Tese (doutorado), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2007.

PINTO, M.E.; STRUCHINER, C.J. HIV-1 diversity: a tool for studying the pandemic. **Cad Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 3, p. 473-484, 2006.

POLITCH, J.A.; MAYER, K.H.; ABBOTT, A.F.; ANDERSON, D.J. The effects of disease progression and zidovudine therapy on semen quality in human immunodeficiency virus type 1 seropositive men. **Fertil Steril**, New York, v. 61, n. 5, p. 922-8, 1994.

PUDNEY, J.; QUAYLE, A.J.; ANDERSON, D.J. Immunological microenvironments in the human vagina and cervix: mediators of cellular immunity are concentrated in the cervical transformation zone. **Biol Reprod**, New York, v. 73, p. 1253-1263, 2005.

QUINN, T.C. Carga viral, circuncisão e transmissão heterossexual. **Hopkins HIV Rep**, Baltimore, v. 12, n. 3, 2000.

RAMSEIER, C.A.; KINNEY, J.S.; HERR, A.E.; BRAUN, T.; SUGAI, J.V.; SHELBURNE, S.A. RAYBURN, L.A. TRAN, H.M.; SINGH, A.K. GIANNOBILE, W.V. Identification of Pathogen and Host-Response Markers Correlated With Periodontal Disease. **J Periodontol**, Chicago, v. 80, p. 436-446, 2009.

REEVES, J.D.; DOMS R.W. Human Immunodeficiency Virus tipe 2. **J Gen Virol**, London, v. 83, p. 1253-1285, 2002.

ROTTINGEN, J.A.; CAMERON, D.W. GARNETT, G.P. A systematic review of the epidemiologic interactions between classic sexually transmitted disease and HIV: how much really is known? **Sex Transm Dis**, Philadelphia, v. 28, p. 579-597, 2001.

SAÏDI, H.; MAGRI, G.; NASREDDINE, N.; RÉQUENA, M.; BÉLEC L. R5- and X4-HIV-1 use differentially the endometrial epithelial cells HEC-1A to ensure their own spread: implication for mechanisms of sexual transmission. **Virology**, New York, v. 358, p. 55-68, 2007.

SCHACKER, T.W.; HUGLES, J.P.; SHEA, T.; COOMBS, K.W.; COREY, L. Biological and virologic characteristics of primary HIV infection. **Ann Intern Med**, Philadelphia, v. 128, p. 613-620, 1998.

SCHENKELS, L.C.; VEERMAN, E.C.; AMERONGEN, A.V. Biochemical composition of human saliva in relation to other mucosal fluids. **Crit Rev Oral Biol Med**, Boca Raton, v. 6, n. 2, p. 161-175, 1995.

SCHUTYSER, E.; STRUYF, S.; MENTEN, P.; LENAERTS, J.P.; CONINGS, R.; PUT, W.; WUYTS, A.; PROOST, P.; VAN DAMME, J. "Regulated production and molecular diversity of human liver and activation-regulated chemokine/macrophage inflammatory protein-3 alpha from normal and transformed cells". **J Immunol**, Baltimore, v. 165, n. 8, p. 4470-7, 2000.

SEXTON, W.M.; LIN, Y.; KRYSCIO, R.J.; DAWSON, D.R.; EBERSOLE, J.L.; MILLER, C.S. Salivary biomarkers of periodontal disease in response to treatment. **J Clin Periodontol**, Copenhagen, v. 38, p. 434-41, 2011.

SHANG, X. Z., and A. C. ISSEKUTZ. 1999. Enhancement of monocyte transendothelial migration by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: requirement for chemoattractant and cd11a/cd18 mechanisms. **Eur J Immunol**, Weinheim, v. 29, p. 3571-3582, 1999.

SIERRA, S.; KUPFER, B.; KAISER, R. Basics of the virology of HIV-1 and its replications. **J Clin Virol**, Amsterdam, v. 34, n. 4, p. 233-244, 2005.

SINGH, A.G.; BESSON, G.; MOBASHER, A.; COLLMAN, R.G. Patterns of chemokine receptor fusion cofactor utilization by human immunodeficiency virus type 1 variants from the lungs and blood. **J Virol**, Washington, v. 73, p. 6680-6690, 1999.

SIMMONS, G.; WILKINSON, D.; REEVES J.D.; DITTMAR M.T.; BEDDOWS S.; WEBER, G.; CARNEGIE, G.; DESSELBERGER, U. GRAY, P.W.; WEISS, R.A.; CLAPHAM, P.R. Primary syncytium-inducing human immunodeficiency virus type 1 isolates are dual-tropic and most can use either Lestr or CCR5 as coreceptors for virus entry. **J Virol**, Washington, v. 70, p. 8355-8360, 1996.

SISPAS, N.V.; KALAMS, S.A.; TROCHA, A.; HE, S.; BLATTNER, W.A.; WALKER, B.D.; JOHNSON, R.P. Identification of type- specific cytotoxic T lymphocyte responses to homologous viral proteins in laboratory workers accidentally infected with HIV-1. **J Clin Invest**, New Haven, v. 99, n. 4, p. 752-762, 1997.

SKOTT, P.; LUCHT, E.; EHNLUND, M.; BJORLING, E. Inhibitory function of secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI) in human saliva is HIV-1 specific and varies with virus tropism. **Oral Dis**, Copenhagen, v. 8, p. 160–167, 2002.

SMITH, A.M.; JOLLEY, D.; HOCKING, J.; BENTON, K.; GEROFI, J. Does additional lubrication affect condom slippage and breakage? **Int J STD AIDS**, London, v. 9, n. 6, p. 330-5, 1998.

SONIS, T.S.; FAZIO R.C.; FANG, L. Síndrome da Imunodeficiência Adquirida e doenças relacionadas. In: **Princípios e práticas de medicina oral**. 2 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1996, cap. 47, p. 429-433.

STINGL, G.; RAPPERSBERGER, K.; TSCHACHELER, E.; GARTNER, S.; GROH, V.; MANN, D.L.; WOLFF, K.; POPOVIC, M. Langerhans cells in HIV-1 infection. **J Am Acad Dermatol**, St. Louis, v. 22, p. 1210-1217, 1990.

STOIBER, H., PRUENSTER, M.; AMMANN, C. G.; DIERICH, M. P. Complement-opsinized HIV: the free rider on its way to infection. **Mol Immunol**, Oxford, v. 42, p. 153-160, 2005.

SZWAREWALD, C.L.; BASTOS, F.I.; CASTILHO, E.A. AIDS: mapa ecológico do Brasil, 1982-1994. In: Coordenação Nacional de DST e AIDS. **A epidemia da AIDS no Brasil, situação e tendência**. Brasil - Ministério da Saúde, 1997, p. 27-44.

TOMÁS, M.S.; CLAUDIA, O.M.; OCANA, V.; NADER-MACIAS, M. Production of antimicrobial substances by lactic acid bacteria. I: determination of hydrogen peroxide. **Methods Mol Biol**, Clifton, v. 268, p. 337–346, 2004.

TURVILLE, S. G., P. U. CAMERON, A. HANDLEY, G. LIN, S. PÖHLMANN, R. W. DOMS, AND A. L. CUNNINGHAM. Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets. **Nat Immunol**, New York, v. 3, p. 975-983, 2002.

UGOLINI, S.; MONDOR, I.; SATTENTAU Q.J. HIV-1 attachment: another look. **Trends Microbiol**, Cambridge, v. 7, p. 144-149, 1999.

UGOLINI, S.; MOULARD, M.; MONDOR, I.; BAROIS, D.; DEMANDOLX, D.; HOXIE, A. ; BRELOT, M. ; ALIZON, J. ; DAVOUST, J. ; SATTENTAU, Q.J. HIV-1 gp 120 induces an association between CD4 and the chemokine receptor CXCR4. **J Immunol**, Baltimore, v. 159, p. 3000-3008, 1997.

UIP, D.E.; TEIXEIRA, M.A.S. Diagnóstico e tratamento das principais infecções oportunistas. In CIMERMAN, S.; CIMERMAN, B. **Condutas em infectologia**, São Paulo:Ed. Atheneu, 2004, cap. 6.2, p.63-70.

UNAIDS / The Joint United Nations Programme on HIV/AIDS 2009. **AIDS epidemic update 09**, 2009. Disponível em: www.unaids.org. Acesso em 10/02/2010.

VERGARA, T.R.C.; BARROSO, P.F. Transmissão sexual do HIV. **Tendências em HIV/AIDS**, v. 1, n. 4, p. 17-24, 2006.

WAHL, S.M.; SMITH, P.D.; JANOFF, E.N. Human Immunodeficiency Virus tipe I infection, mucosal immunity, and pathogenesis: comments and conference summary, **J Infect Dis**, Oxford v. 179, p: S397-S400, 1999.

WAINBERG, M.A.; JEANG K.T. 25 years of HIV-1 research – progress and perspectives. **BMC Med**, London, v. 31, p. 6:31. 2008.

WAKABAYASHI, H.; KONDO, I.; KOBAYASHI, T.; YAMAUCHI, K.; TOIDA, T.; IWATSUKI, K.; YOSHIE, H. Periodontitis, periodontopathic bacteria and lactoferrin. **Biomaterials**, Oxford, v. 23, p. 419–424, 2010.

WEINBERG, A.; QUINONES-MATEU, M.E.; LEDERMAN, M.M. Role of human beta-defensins in HIV infectious. **Adv Dent Res**, Washington. v. 19, p. 42-48, 2006.

WEISS, R.A. Gulliver's travels in HIVland. **Nature**, London v. 410, n. 6831, p. 963-7, 2001.

WOLBANK, S.; KURNET, R.; STIEGLER, G.; KATINGER, H. Characterization of human class-switched polymeric (immunoglobulin m [igm] and iga) anti-human immunodeficiency virus type 1 antibodies 2f5 and 2g12. **J Virol**, Washington, v. 77, p. 4095-4103, 2003.

WROCLAWSKI, M.L. Hemospermia In In: NARDOZZA A.J.; DOS REIS, R.B.; CAMPOS, R.S.M. **Manual de Urologia – Sociedade Brasileira de Urologia**, Cap. 1, p. 21-27, 2010.

WU, L.; LAROSA, G.; KASSAM, N.; GORDON, C.J.; HEATH, H.; RUFFING N.; CHEN, H.; HUMBLIAS, J.; SAMSON M.; PARMENTIER, M.; MOORE, J.P.; MACKAY, C.R. Interaction of chemokine receptor CCR5 with its ligands: multiple domains for HIV-1 gp 120 binding and a single domain for chemokine binding. **J Exp Med**, New York, v. 186, p. 1373-138, 1997.

YEAMAN, G.R.; ASIN, S.; WELDON, S.; DEMIAN, D.J.; COLLINS, J.E.; O'CONNELL, D.M.; ASIN, S.N.; WIRA, C.R.; FANGER, M.W. Human immunodeficiency virus receptor and coreceptor expression on human uterine epithelial cells: regulation of expression during the menstrual cycle and implications for human immunodeficiency virus infection. **Immunology**, Oxford, v. 109, p. 137-146, 2003.

ZIMECKI, M.; MAZURIER, J.; MACHNICKI, M.; WIECZOREK, Z.; MONTREUIL, J.; SPIK, G. Immunostimulatory activity of lactotransferrin and maturation of CD4⁺ CD8⁺ murine thymocytes. **Immunol Lett**, Amsterdam, v. 30, p. 119–23, 1991.

ZHANG, Z.; SCHULER, T.; ZUPANCIC, M.; WIETGREFE, S.; STASKUS, K.A.; REIMANN K.A.; REINHART, T.A.; ROGAN, M.; CAVERT, W.; MILLER, C.J.; VEAZEY, R.S.; NOTERMANS, D.; LITTLE, S.; DANNER, S.A.; RICHMAN, D.D.; HAVLIR, D.; WONG, J.; JORDAN, H.L.; SCHACKER, T.W.; RACZ, P.; TENNER-RACZ, K.; LETVIN, S.; WOLINSKY, S.; HAASE, A.T. Sexual transmission and propagation of SIV and HIV in resting and activated CD4⁺ T cells. **Science**, New York, v. 286, p. 1353-1357, 1999.

ANEXOS

ANEXO A



Mem. nº 1610/2009
GS-3.3/AES

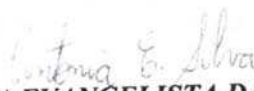
Ribeirão Preto, 14 de dezembro de 2009

Ilustríssimo Senhor
ALAN GRUPIONI LOURENÇO
Unidade Especial de Tratamento de Doenças Infecciosas - UETDI

Prezado Senhor,

Atendendo solicitação da Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP, Dr^a Marcia Guimarães Villanova, encaminho a Vossa Senhoria Parecer nº 876/2009, referente ao Projeto de Pesquisa intitulado **“CAPACIDADE DA LACTOFERRINA E DE SEUS PRODUTOS DE CLIVAGEM DE MODULAR À INFECÇÃO PELO HIV-1 NAS SECREÇÕES ORAIS E GENITAIS”**, de acordo com o Processo HCRP nº 4926/2009.

O parecer informa que seu projeto encontra-se **APROVADO**.
Atenciosamente.


ANTONIA EVANGELISTA DA SILVA
Encarregada do Setor de Comissões
R.F. nº 8241

ANEXO B**Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.**

**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido dirigido ao participante
voluntário sem infecção pelo HIV**

Convidamos o senhor (a) para participar do nosso estudo sobre componentes salivares e de outros fluidos corporais frente à infecção pelo HIV.

Nome do Estudo: Capacidade da lactoferrina e de seus produtos de clivagem de modular à infecção pelo HIV-1 nas secreções orais e genitais.

Pesquisador Principal: Alan Grupioni Lourenço.

Outros pesquisadores: Prof^ª. Dr^ª. Alcyone Artioli Machado;

Fones de Contato: (16) 39515173; (16) 36022695; (16) 36022625.

ESCLARECIMENTO AO SUJEITO DA PESQUISA

Esse trabalho irá estudar as substâncias existentes na saliva (bochecho e cuspe), no fluido vaginal e no sêmen, capazes de defender o organismo contra a infecção pelo HIV. O trabalho tem como pesquisador principal Alan Grupioni Lourenço que pode ser localizado, para o esclarecimento de qualquer dúvida ou assistência aos participantes da pesquisa pelos telefones (16) 36022695 ou (16) 39515173, ou ainda no endereço: Avenida Bandeirantes 3900 – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - 6^o andar. Embora o estudo seja sobre HIV, necessitamos também da participação de voluntários que não são HIV positivos, para que nós possamos comparar as substâncias existentes em pacientes com HIV com aqueles que não tenham o HIV, por isso estamos solicitando sua participação nessa pesquisa.

Caso concorde em participar desta pesquisa, o senhor (a) responderá algumas perguntas sobre suas condições de saúde geral e bucal (condições dos seus dentes), além de ser submetido a um exame de boca, no qual será avaliado a existência ou não de alguma ferida, e por fim será coletado um pouco de saliva 5ml (bochecho e cuspe), o equivalente à 1 colher das de chá. Também será realizada a coleta de 10 ml de sangue o que equivale a 2 colheres das de chá. Esse procedimento causa um leve desconforto devido à picada da agulha em seu braço direito ou esquerdo.

A secreção vaginal (se for mulher) será coletada através de uma escovinha pelo seu próprio médico ginecologista do Hospital das Clínicas. Esse procedimento não lhe causará grande desconforto, e será realizado ao mesmo tempo em que o médico realizará seu exame de rotina, ou seja, a senhora **NÃO** realizará um exame exclusivamente para essa pesquisa.

O sêmen (se for homem) será coletado através de masturbação, que deverá ser realizado SEM o auxílio de lubrificantes ou água.

O senhor (a) **NÃO** precisará voltar ao hospital para concluir qualquer etapa adicional da pesquisa, e **NÃO** terá nenhum gasto adicional para participar da pesquisa, pois todas as amostras serão coletadas ainda hoje caso o senhor (a) aceite participar da pesquisa e, portanto, não prevemos ressarcir-lo por gastos decorrentes de sua participação da pesquisa.

Depois que coletarmos suas amostras, elas serão congeladas e parte delas serão enviadas à França para a dosagem de algumas substâncias protetoras do HIV, outra parte será analisada aqui mesmo na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Os resultados da pesquisa poderão ser apresentados em congressos, em reuniões médicas e de dentistas, **mas seu nome jamais aparecerá**. Nós fotografaremos sua boca caso o senhor (a) apresente alguma ferida na boca, mas seu rosto não aparecerá, e não haverá seu nome em qualquer documento que o identifique.

Gostaríamos de esclarecer que sua participação no estudo é voluntária e caso o senhor(a) deseje abandonar o estudo, não haverá qualquer tipo de represália ou constrangimento, bem como nada mudará o seu atendimento nesta unidade do hospital.

O senhor (a) continuará sendo atendido pelo seu médico. O senhor (a) não será identificado, o seu nome não aparecerá.

Essa pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, esse comitê tem a função verificar se o trabalho é ético, ou seja, se ele não levará a nenhum risco de saúde, constrangimentos, e ainda assegurar os direitos dos participantes da pesquisa. Caso o senhor (a) necessite ou queira entrar em contato com o comitê de ética que aprovou essa pesquisa entre em contato pelo telefone: 3602 2228, ou no endereço: Avenida dos Bandeirantes 3900 – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - subsolo.

Eu _____.

Abaixo assinado, tendo sido esclarecido devidamente sobre as condições que constam do documento “ESCLARECIMENTO AO SUJEITO DA PESQUISA” de que trata o projeto intitulado “CAPACIDADE DA LACTOFERRINA E DOS SEUS PRODUTOS DE CLIVAGEM DE MODULAR À INFECÇÃO PELO HIV-1 NAS SECREÇÕES ORAIS E GENITAIS” que tem como pesquisador responsável o Sr. Alan Grupioni Lourenço. Declaro que tenho pleno conhecimento dos direitos e das condições que me foram asseguradas, a seguir relacionados.

1. A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida a respeito dos procedimentos, riscos, benefícios e de outras situações relacionadas com a pesquisa a que serei submetido.

2. A liberdade de retirar meu consentimento e deixar de participar do estudo, a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo ao meu atendimento nesse hospital.

3. A segurança de que não serei identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada à minha privacidade.

4. O compromisso de que será prestada informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar a minha vontade de continuar dele participando.

5. A garantia de assistência integral e de indenização por qualquer dano ou risco a minha saúde em decorrência da minha participação nessa pesquisa.

Esse termo de consentimento foi redigido em DUAS VIAS, sendo que uma via assinada ficará com o pesquisador responsável, E OUTRA VIA ASSINADA FICARÁ COM O PARTICIPANTE DA PESQUISA.

Declaro, ainda que concordo inteiramente com as condições que me foram apresentadas e que, livremente, manifesto a minha vontade em participar do referido projeto.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de 20__

Assinatura do pesquisador

Assinatura do participante

ANEXO C

**Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.**

**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido dirigido ao participante
voluntário infectado pelo HIV.**

Convidamos o senhor (a) para participar do nosso estudo sobre componentes salivares e de outros fluidos corporais frente à infecção pelo HIV.

Nome do Estudo: Capacidade da lactoferrina e de seus produtos de clivagem de modular à infecção pelo HIV-1 nas secreções orais e genitais.

Pesquisador Principal: Alan Grupioni Lourenço.

Outros pesquisadores: Prof^ª. Dr^ª. Alcyone Artioli Machado;

Fones de Contato: (16) 39515173; (16) 36022695; (16) 36022625.

ESCLARECIMENTO AO SUJEITO DA PESQUISA

Esse trabalho irá estudar as substâncias existentes na saliva (bochecho e cuspe), no fluido vaginal e no sêmen, capazes de defender o organismo contra a infecção pelo HIV. O trabalho tem como pesquisador principal Alan Grupioni Lourenço que pode ser localizado, para o esclarecimento de qualquer dúvida ou assistência aos participantes da pesquisa pelos telefones (16) 36022695 ou (16) 39515173, ou ainda no endereço: Avenida Bandeirantes 3900 – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - 6^o andar.

Caso concorde em participar desta pesquisa, o senhor(a) responderá algumas perguntas sobre suas condições de saúde geral e bucal (condições dos seus dentes), além de ser submetido a um exame de boca, no qual será avaliado a existência ou não de alguma ferida, e por fim será coletado um pouco de saliva 5ml (bochecho e cuspe), o equivalente à 1 colher das de chá. Também será realizada a coleta de 10 ml de sangue o que equivale a 2 colheres das de chá. Esse procedimento causa um leve desconforto devido à picada da agulha em seu braço direito ou esquerdo.

A secreção vaginal (se for mulher) será coletada através de uma escovinha pelo seu próprio médico ginecologista do Hospital das Clínicas. Esse procedimento não lhe causará grande desconforto, e será realizado ao mesmo tempo que o médico realizará seu exame de rotina, ou seja, a senhora **NÃO** realizará um exame exclusivamente para essa pesquisa.

O sêmen (se for homem) será coletado através de masturbação, que deverá ser realizado SEM o auxílio de lubrificantes ou água.

O senhor (a) **NÃO** precisará voltar ao hospital para concluir qualquer etapa adicional da pesquisa, e **NÃO** terá nenhum gasto adicional para participar da pesquisa, pois todas as amostras serão coletadas ainda hoje caso o senhor (a) aceite participar da pesquisa e portanto, não prevemos ressarcir-lo por gastos decorrentes de sua participação da pesquisa.

Depois que coletarmos suas amostras, elas serão congeladas e parte delas serão enviadas à França para a dosagem de algumas substâncias protetoras do HIV, outra parte será analisada aqui mesmo na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Os resultados da pesquisa poderão ser apresentados em congressos, em reuniões médicas e de dentistas, **mas seu nome jamais aparecerá**. Nós fotografaremos sua boca caso o senhor (a) apresente alguma ferida na boca, mas seu rosto não aparecerá, e não haverá seu nome em qualquer documento que o identifique.

Gostaríamos de esclarecer que sua participação no estudo é voluntária e caso o senhor (a) deseje abandonar o estudo, não haverá qualquer tipo de represália ou constrangimento, bem como nada mudará o seu atendimento nesta unidade do hospital.

O senhor (a) continuará sendo atendido pelo seu médico. O senhor (a) não será identificado, o seu nome não aparecerá.

Essa pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, esse comitê tem a função verificar se o trabalho é ético, ou seja, se ele não levará a nenhum risco de saúde, constrangimentos, e ainda assegurar os direitos dos participantes da pesquisa. Caso o senhor (a) necessite ou queira entrar em contato com o comitê de ética que aprovou essa pesquisa entre em contato pelo telefone: 3602 2228, ou no endereço: Avenida dos Bandeirantes 3900 – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - subsolo.

Eu _____.

Abaixo assinado, tendo sido esclarecido devidamente sobre as condições que constam do documento “ESCLARECIMENTO AO SUJEITO DA PESQUISA” de que trata o projeto intitulado “CAPACIDADE DA LACTOFERRINA E DOS SEUS PRODUTOS DE CLIVAGEM DE MODULAR À INFECÇÃO PELO HIV-1 NAS SECREÇÕES ORAIS E GENITAIS” que tem como pesquisador responsável o Sr. Alan Grupioni Lourenço. Declaro que tenho pleno conhecimento dos direitos e das condições que me foram asseguradas, a seguir relacionados.

1. A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida a respeito dos procedimentos, riscos, benefícios e de outras situações relacionadas com a pesquisa a que serei submetido.

2. A liberdade de retirar meu consentimento e deixar de participar do estudo, a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo ao meu atendimento nesse hospital.

3. A segurança de que não serei identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada à minha privacidade.

4. O compromisso de que será prestada informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar a minha vontade de continuar dele participando.

5. A garantia de assistência integral e de indenização por qualquer dano ou risco a minha saúde em decorrência da minha participação nessa pesquisa.

Esse termo de consentimento foi redigido em DUAS VIAS, sendo que uma via assinada ficará com o pesquisador responsável, E OUTRA VIA ASSINADA FICARÁ COM O PARTICIPANTE DA PESQUISA.

Declaro, ainda que concordo inteiramente com as condições que me foram apresentadas e que, livremente, manifesto a minha vontade em participar do referido projeto.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de 20__

Assinatura do pesquisador

Assinatura do participante

ANEXO D

Data do exame:

IDENTIFICAÇÃO. Nome: Data de nascimento: Endereço: Bairro:	Nº do registro: Sexo: Idade: nº Tel.: Cidade:
---	---

HISTÓRIA MÉDICA.

1. Está sobre tratamento médico: ☐ Sim ☐ Não. Há quanto tempo? _____
2. ☐ Perdeu ou ☐ ganhou peso nos últimos meses?
3. Tem manchas ou lesões na pele? ☐ Sim ☐ Não.
4. Costuma ter ínguas (gânglios infartados) em alguma região do corpo? ☐ Sim ☐ Não.
5. Tem o hábito de fumar? ☐ Sim ☐ Não. Quantos cigarros/dia?
6. Tem o hábito de ingerir bebidas alcoólicas? ☐ Sim ☐ Não. Com qual frequência?

Sobre a AIDS:

7. É soropositivo? ☐ Sim ☐ Não. Categoria da Aids:
8. Qual é o tempo de soropositividade? _____ anos.
9. Qual foi o tipo de exposição à contaminação?
10. Está tomando algum medicamento? ☐ Sim ☐ Não.
Qual _____.
11. Faz uso de antiretrovirais? ☐ Sim ☐ Não. Quais? _____
12. Teor de LT CD-4⁺ (últimos 3 meses)
13. Qual a carga viral?
14. Apresenta ou já apresentou alguma dessas manifestações sistêmicas:

<input type="checkbox"/> Pneumonia por <i>Pneumocystis carinii</i>	<input type="checkbox"/> Candidíase.
<input type="checkbox"/> Criptococose	<input type="checkbox"/> Histoplasmose
<input type="checkbox"/> Tuberculose	<input type="checkbox"/> Micobacteriose atípica
<input type="checkbox"/> Doença periodontal	<input type="checkbox"/> Úlceras aftóides
<input type="checkbox"/> Infecção por Citomegalovírus	<input type="checkbox"/> Herpes simples
<input type="checkbox"/> Herpes Zoster	<input type="checkbox"/> Toxoplasmose
<input type="checkbox"/> Estrongiloidiase pulmonar ou disseminada	
15. Achados ginecológicos:
16. Achados urológicos:

História Estomatológica.

17. Costuma ter placas brancas na boca ☐ Sim ☐ Não.
18. Sente sua gengiva irritada? ☐ Sim ☐ Não.
19. Sente seus dentes abaulados? ☐ Sim ☐ Não
20. Já realizou algum tipo de tratamento periodontal? ☐ Sim ☐ Não.
21. Faz controle periódico de placa e tártaro? ☐ Sim ☐ Não.
22. Faz o uso do fio dental? ☐ Sim ☐ Não
23. Está satisfeito com sua saúde oral? ☐ Sim ☐ Não
24. Teve alguma lesão na boca a pouco tempo? ☐ Sim ☐ Não.
25. Faz uso de Prótese? ☐ Total ☐ PPR ☐ Fixa ☐ Implantes.
26. Existe alguma informação importante que não foi perguntada?
27. Observações:

ARTIGOS

Seminal plasma Lf and its cleavage product (G-12-I) its capacity to stimulate the production of CCL20 by the endocervical epithelial cells: Involvement in the sexual transmission of HIV

Keywords: HIV/AIDS, sexual transmission, seminal plasma, CCL20, lactoferrina, endocervical epithelial cells.

Autors: Alan Grupioni Lourenço¹, Alcyone Artioli Machado¹, Marilena Chinalli Komesu², Silvana Maria Quintana³, Thomas Bourlet⁴, Bruno Pozzetto⁴, Olivier Delézay⁴

Institutions: ¹ Division of Infectious Diseases, Department of Internal Medicine, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto – Brazil; ² Department of Morphology, Stomatology and Physiology, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto – Brazil; ³ Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto – Brazil; ⁴ GIMAP, Groupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes, Faculté de Médecine J. Lisfranc, Saint Etienne, France

Corresponding author:

Olivier Delézay

To whom correspondence should be addressed at: GIMAP, Faculté de Médecine Jacques Lisfranc, 42023 Saint-Etienne cedex 02, France.

E-mail: delezay@univ-st-etienne.fr

ABSTRACT

Heterosexual human immunodeficiency virus (HIV) transmission implies the crossing of the vaginal mucosa by virions present in the semen, potentially using Langerhans cells as transporters. The recruitment of these cells in the mucosa is mediated by the Chemokine (C-C motif) ligand 20 (CCL20).

This study was performed in order to analyze the effect of seminal plasma from HIV+ or HIV- on in vitro production of CCL20 by monostratified endocervical epithelium cells (HEC-1A) and its relationship with lactoferrin (Lf) concentration and its products of clivage.

HEC 1A cells were incubated with HIV- or HIV+ seminal plasmas. The measurement of CCL20 production in the supernatants of HEC 1A cells, and of Lf in seminal plasma, was quantified using ELISA. Western blot analysis was performed to determine the identity of Lf and its cleavage products. We performed the fraction of seminal plasma proteins by a poll of HIV- participants. Each fraction was tested to check its ability to stimulate the production of CCL20 and the concentration of Lf.

We observed a higher stimulation of the production of CCL20 from the HIV+ seminal plasma samples related to HIV- seminal plasma; CCL20 production by HEC-1A cells correlated with Lf and its cleavage products; and seminal plasma fractions with higher concentrations of Lf responsible for the greatest stimulus in the secretion of CCL20 by HEC-1A cells.

We conclude that lactoferrin present in seminal plasma was correlated with increased CCL20 production by HEC-1A cells, and therefore can act as a facilitator for the entry of HIV by female genital mucosa.

Keywords: HIV/AIDS, sexual transmission, seminal plasma, CCL20, lactoferrina, endocervical epithelial cells.

INTRODUCTION

Sexual transmission of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) accounts for 60–90% of new infections, especially in developing countries (UNAIDS, 2009). During male-to-female transmission, the virus is typically deposited in the vagina as cell-free or cell associated virions carried by semen (DONCEL; JOSEPH; THURMAN, 2011). In the absence of breaches in the vaginal mucosa, the mechanisms involved in the crossing of vaginal epithelium by HIV could involve the recruitment of immune cells that possess migratory properties, including macrophages, lymphocytes or Langerhans cells (LCs), which can be considered as the first target cells for this virus (LORE; LARSSON, 2003). Entry may occur through the vagina, ectocervix, or endocervix. The epithelial architecture is variable in these regions. The epithelium of the vagina and ectocervix is composed by multi-layered, pluristratified epithelial cells that do not form a polarized epithelium. In contrast, the epithelium of the endocervix is a single layer of polarized, columnar epithelial cells with tight junctions, dividing the epithelium into apical and basolateral domains (SHEN; RICHTER; SMITH, 2010). These simple mono-layered epithelia provide a lower degree of protection.

The Chemokine (C-C motif) ligand 20 (CCL20) is secreted by epithelial cells from numerous tissues such as skin (CHARBONNIER et al., 1999; DIEU-NOSJEAN et al., 2000) and oral (ABIKO et al., 2003) or vaginal epithelium (CREMEL et al., 2005). CCL20 is an important immune effector molecule that is chemotactic for immature dendritic cells (DC) and lymphocytes. (LIAO et al., 1999; SCHUTYSER et al., 2003). DC also likely contribute to the array of cells potentially involved in HIV entry into the vaginal and ectocervical mucosae. DC efficiently capture, disseminate, and transmit virus to mononuclear target cells, however, HIV do not productively infect the DC themselves (SHEN; RICHTER; SMITH, 2010). CCL20 secretion by human vaginal epithelial cells has been shown to be enhanced in the presence of semen resulting in chemoattraction of Langerhans cells which are permissive to HIV infection (BERLIER et al, 2006), but the identification of the compounds involved in this stimulation is not characterized. One of the potential candidates that could stimulate CCL20 secretion by female genital epithelial cells is Lactoferrin (Lf). Lf is a glycoprotein of the transferrin family with molecular mass of 80 kDa and present in large amounts and various secretions. The Lf is considered an important element of nonspecific humoral immunity and has a protective effect, particularly against HIV (GROOT et al., 2005; KAZMI

et al, 2006). If the Lf has a protective effect against infections, including infection by HIV, studies show that some peptides from the cleavage of this protein by enzyme elastase or proteinase type III have stronger pro-inflammatory activity in mucous membranes (KOMINE et al., 2005; KOMINE et al., 2007).

This study was performed in order to analyze the effect of seminal plasma from HIV seronegative (HIV-) and HIV seropositive (HIV+) participants on CCL20 produced by culture of monostratified endocervical epithelium (HEC-1A) and to try to correlate such secretion with Lf concentration.

MATERIALS AND METHODS

Seminal plasmas samples

Semen samples were collected from HIV+ and HIV- patients. The patients gave their fully informed written consent. The project was approved by Ethics Committee of Clinical Hospital, School of Medicine Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil (CH-SMRP-USP). HIV- men were tested for the presence/absence of other infectious disease. Sperms were obtained by masturbation into a sterile container and processed within 4 h after ejaculation. After being diluted 1:2 in phosphate-buffered saline (PBS), seminal plasma was separated from the cell fraction by centrifugation (800 g, 30 min) and stored at -80°C until use. Seminal plasma was sent to Groupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes, Faculté de Médecine J. Lisfranc, Saint Etienne, France for analysis.

Cell culture

HEC-1A cell line was routinely grown in Dulbecco's minimal essential medium DMEM-F12 medium (Cambrex BioScience, Verviers, Belgium) supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS) and antibiotic-antimycotic solution (penicillin-streptomycin-amphotericin B, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). For stimulation experiments, the cells were seeded onto 96-well culture plates (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA) at a density of 200 000 cells/well and cultured for 2 days before use.

Measurement of CCL20 secretion by HEC-1A cells

HEC 1A cells were incubated with HIV- or HIV+ seminal plasmas (diluted 1:10 in culture medium) or recombinant human interleukin IL1- β (25 ng/ml, Peprotech), as positive control, or treated only with culture medium DMEM-F12, as negative control. The production

of CCL20 in the supernatants of HEC 1A cells after 17 h (overnight) of treatment was quantified using ELISA detection kits (Quantikine, R&D systems, Abingdon, UK) according to the manufacturer's instructions. Optical densities were measured at 450 nm. Each assay was performed in duplicate. The results are expressed as the relative CCL20 production compared to negative control (absence of treatment).

Viral load in seminal plasma

Viral load in seminal plasma samples from HIV+ were performed using commercially available kits. The detection limite was 50 copies/ml.

Measurements of Lf in seminal plasmas samples.

Measurements of Lf in seminal plasma were performed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). A standard curve was prepared by using different concentrations of Lf (Lactoferrin from human milk – Sigma Aldrich). Seminal plasma samples (1:10 in PBS) were distributed in wells (100µl/well), and incubated in at 37°C for 1 hour. Sigma Albumin from Chicken Egg Whites was used for blocking and Lf was detected with anti-lactoferrin Ab (Rabbit Anti-human lactoferrin-SIGMA L3262) incubated for 1hour at room temperature followed by peroxydase conjugated anti-rabbit antibodies. After several washes, OPD was used as substrate and Optical densities at 492nm were measured. Each assay was performed in duplicate.

Measurement of total protein in seminal plasma

The Bradford technique was used for the measurement of the total protein content in 34 seminal plasma samples. Seminal plasma was diluted 1:75 in PBS and placed 150 µl/well (in triplicate) where was added 150µl/well Bradford Reagent (SIGMA). Bovine serum albumine

(BSA) was used to perform the standard curve. The reading was held on ELISA reader at 590 nm optical density.

Wester Blot

Western blot analysis was performed to determine the identity of lactoferrin and its cleavage products in six seminal plasma samples. Samples (5µg each) were loaded on a 10% agarose gel and subjected to electrophoresis. Lf and its cleavage products (the synthetic peptide G-12-I: GQKDLLFKDSAI) were then transferred from the gel to a nitrocellulose membrane and probed with rabbit anti-Lf polyclonal (Rabbit anti-human lactoferrin - SIGMA L3262) and probed with polyclonal chromatography affinity purified anti-peptide G-12-I.

Fractionation of seminal plasma HIV-, ion exchange chromatography

Seminal plasmas diluted 1:10 in 50 mM NaCl pH7.4 (Buffer A) was applied onto column of affinity (Hitrap Q FF; GE Healthcare) equilibrated at room temperature with same buffer. A discontinuous gradient was used for the elution of seminal plasma proteins by using same buffer containing 500 mM NaCl (buffer B). Six different concentrations of buffer B (5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%) were passed through the column at a flow rate of 0.5 ml/min on Pharmacia HPLC AKTA purifier system. The different fractions were evaluated for their ability to induce CCL20 secretion by HEC1A cells as well as for Lf and proteins content as described above. The fractions that more induced the CCL20 production were subjected to Western blot analysis to determine the Lf e their cleavage products as described above.

Statistical analysis

Graph Pad Prism 5 for Windows ® (InStat, USA) was used, and data was statistically analyzed with Mann-Whitney test and the Spearman correlation coefficient.

RESULTS

Seminal plasma promotes the induction of secretion of CCL20 by monostratified endocervical epithelium cells

The secretion of CCL20 was measured by ELISA in supernatants of HEC-1A cells incubated with only culture medium DMEM-F12 (negative control) or with Interleukin-1 beta (IL-1 β) (25ng/ml, positive control) or with seminal plasma (diluted 1:10 in DMEM-F12), after 17 hours of treatment.

The supernatant of untreated HEC-1A cells (control group, 4 experiments) showed a CCL20 concentration of 72 ± 28 pg / ml. IL-1 β treatment greatly stimulated this secretion (750 ± 88 pg / ml of CCL20) positive control (p 0.0286). As already described (BERLIER et al., 2006), seminal plasma increased CCL20 secretion: The CCL20 concentration obtained in the supernatant of HIV- seminal plasma treated cells was 459 ± 91 pg / ml (p 0.0011) (Figure 1-A).

Stimulation of HEC-1A cells was also conducted with 22 seminal plasma samples of HIV+ participants and 12 samples of HIV- seminal plasma from HIV- participants. The seminal plasma of HIV- participants stimulated 5.38 ± 0.91 times the concentration of CCL20 in relation to its control group (untreated cells), while the seminal plasma of HIV+ participants stimulated 7.57 ± 3.26 times the CCL20 production in relation to its control group. It was possible to observe a greater stimulation of the production of CCL20 from the seminal plasma samples from HIV+ participants (p 0.022) (Figure 1-B).

Correlation between viral load in seminal plasma and its ability to stimulate the production of CCL20 on HEC-1A cells.

On performing the HIV-1 viral loads on 22 samples of seminal plasma HIV+, and comparing the CCL20 production from HEC-1A cell. We found no correlation between HIV viral load in seminal plasma and the production of CCL20 (r: 0.3352, CI: -0.1138 - 0.6706, p 0.1272). The five seminal plasma viral load detected (> 50 copies / ml) increased the

production of CCL20 in 10.3 ± 4.2 times compared to untreated cells (control group), and the 17 seminal plasma viral load considered undetectable (<50 copies / ml) stimulated the production of CCL20 in 6.7 ± 2.6 times. The difference on seminal plasma viral load, although the greater stimulation in the secretion of CCL20 on detected viral load (> 50 copies / ml), was not statistically significant when compared with the undetectable group (<50 copies / ml) (p 0.061) (Figure 1C).

CCL20 production by HEC-1A cells is correlated with Lf in seminal plasma.

We studied the correlation between total protein and Lf in seminal plasma and the CCL20 stimulation of secretion on HEC-1A cells. Total protein and Lf measurements were performed by ELISA in seminal plasma from 12 HIV- and 22 HIV+ seminal plasma and correlated with their respective stimuli in the production of CCL20 by HEC-1A cells supernatant. No correlations was observed between seminal plasma total protein in samples and their stimulation in the secretion of CCL20 by HEC-1 cells for HIV- (r : -0.1261, CI: -0.6638 - 0.4975, p 0.6962) or HIV + samples (r : 0, 1666, CI: -0.2867 - 0.5589, p 0.4588) and their stimulation in the secretion of CCL20 by HEC-1 cells.

In contrast, a positive correlation, considered statistically significant, was observed between Lf concentration in seminal plasma and CCL20 secretion (r : 0.5557 CI 0.2581 to 0.7570, p 0.0006) (Figure 2). In the case of HIV+ seminal plasma samples, the correlation was (r : 0.4613, CI: 0.03592 to 0.7452, p 0.030), however, for seronegatives it was considered not statistically significant, probably due to the smaller number of cases in this group (r : 0.5105, CI: -0.1090 - 0.8444, p 0.089) (Figure 2).

Correlation between CCL20 production by HEC-1A cells and the presence of Lf degradation products in seminal plasma

We performed a western blot with the three HIV+ seminal plasma samples that were responsible of the greatest production of CCL20 by HEC-1A cells, and three HIV+ seminal plasma samples that were less efficient for this CCL20 stimulation.

Figure 3-A shows that the Lf could be detected in similar amounts in all the samples. Although inconclusive, the detection of the cleavage peptide G-12-I seems to be correlated with the ability of sample to promote CCL20 secretion: The amount of Lf cleavage products detected by using anti-G-12-I antibodies was greater in samples that were responsible of higher CCL20 secretion (Figure 3-B).

Seminal plasma fractions with higher concentrations of Lf were responsible for the greatest stimulus in the secretion of CCL20 by HEC cells.

In order to verify whether Lf and their cleavage products present in seminal plasma were able to stimulate the production of CCL20 by HEC-1A cells, we performed the fractionation of seminal plasma proteins by a pull of 12 HIV- participants. Each fraction was tested to check its ability to stimulate the production of CCL20, the concentration of Lf and total protein.

As seen in Figure 4-A/B, the stimulation of the CCL20 secretion by HEC-1A cells was associated with the presence of Lf in the fraction. Once again, the level of CCL20 secretion dependent on the presence of Lf cleavage products as evidenced in western blot experiment (Fig. 4-C).

DISCUSSION

Heterosexual transmission is the most common mode for HIV transmission resulting in the significant increase of HIV-infected women in recent years (CONH; CLARK, 2003, NUNES et al., 2004).

Due to anatomical specificity, women are more susceptible to HIV transmission, because of the larger area in vaginal mucosa which is exposed to the male semen, and because semen contains higher concentrations of virus than vaginal fluid (CHIRIBOGA, 1997).

Seminal plasma confers a survival advantage to sperm within hostile female genital tract (DENISON et al., 1999). However, recent studies show that the seminal plasma provides a set of signaling molecules for vaginal mucosa, which are capable of interact with epithelial cells in the female reproductive tract, these interactions trigger molecular and cellular changes that resemble an inflammatory response (ROBERTSON, 2005).

Signaling molecules present in seminal plasma may increase the secretion of chemokines and cause vascular changes that led to a recruitment and activation of macrophages, granulocytes and dendritic cells (SHARKEY et al, 2007) among them Langerhans cells. (BERLIER, et al 2005).

Langerhans cells present in the vaginal mucosa are known as "Trojan horse" for facilitating the passage of HIV through the vaginal mucosa and present them to CD4 +. (PIGUET, BLAUVELT, 2002).

The CCL20 is the main chemokine for Langerhans cells recruitment and its production by epithelial cells could be related to an increased risk of HIV infection. In this way, Li and cols (2009) demonstrated that the reduction of CCL20 secretion by epithelial cells treated with glycerol monolaurate, a vaginal microbicide, prevented mucosal SIV transmission. Such data reinforces the role of CCL20 in HIV contamination process.

In our study, we found that seminal plasma originated from HIV- and HIV+ patients are able to stimulate the production of CCL20 by HEC-1A. The seminal plasma derived from HIV+ patients promoted a higher CCL20 induction of CCL20 secretion by HEC-1A cells compared with HIV- patients, this result confirms those from BERLIER and cols. (2006) who found a higher increase in production of CCL20 of vaginal epithelial cells (SiHa) (in vitro) stimulated with HIV+ seminal plasma, however without statistical significance.

Sharkey and cols. (2007) also showed that human seminal plasma is capable of interact with cervical and vaginal tissues inducing the production of proinflammatory cytokines.

Cremel and cols (2005) demonstrated that vaginal epithelial cells increased their secretion of CCL20 in response to stimulation by proinflammatory cytokine IL-1 β . Our study showed that seminal plasma from the HIV+ and HIV- participants produces similar effects on the cells lining the endocervical monoestratified (HEC-1A), suggesting that seminal plasma contains components able to generate a response, even if not specific, in the female genital mucosa, mediated by CCL20 secretion.

A possible candidate for the stimulation of CCL20 by epithelial cells of the female reproductive tract is Lf. This protein is able to reduce the ability of dendritic cells to capture antigens, including HIV, because of its interference with the viral gp 120 and DC-SIGN receptor (GROOT et al., 2005). However, despite this protective effect against HIV, the peptides from the cleavage of this protein have a high pro-inflammatory activity (KOMINE et al. 2005; KOMINE et al., 2007).

In our study we found a correlation between the concentration of Lf in seminal plasma and the production of CCL20 stimulated by HEC-1A. Unfortunately we failed to demonstrate that the Lf present in seminal plasma was the molecule responsible for the production of CCL20. Indeed, we could not exclude the fact that another factor could be responsible of the production of CCL20.

We observed a greater presence of the Lf cleavage peptide (G-12-I) in seminal plasma samples HIV+ which seems to be associated with a more important CCL20 production by HEC-1A cells, comparing with seminal plasma samples HIV+ that less promoted the stimulation of CCL20. However, this evidence was not conclusive.

Another finding of our study that confirms the participation of Lf and its cleavage products as activating factors of increased secretion of CCL20 genital mucosal cells is the result obtained after of chromatography fractionation performed in a pool of 12 HIV-participants. In this experiment, we conducted the seminal plasma protein fractionation, evaluating the concentrations of Lf in each fraction and its ability to induce the production of CCL20 by HEC-1A cells. The fractions that were the most efficient for CCL20 secretion stimulation were those containing the highest concentration of Lf and cleavage products determined by western blot.

All these data argue in favour of a significant role of lactoferrin degradation products on CCL20 secretion by female genital mucosa. Despite the need of other studies confirming

the involvement of semen Lf degradation products in CCL20 secretion, the role of these proteins must be considered for the prevention of HIV heterosexual contamination process.

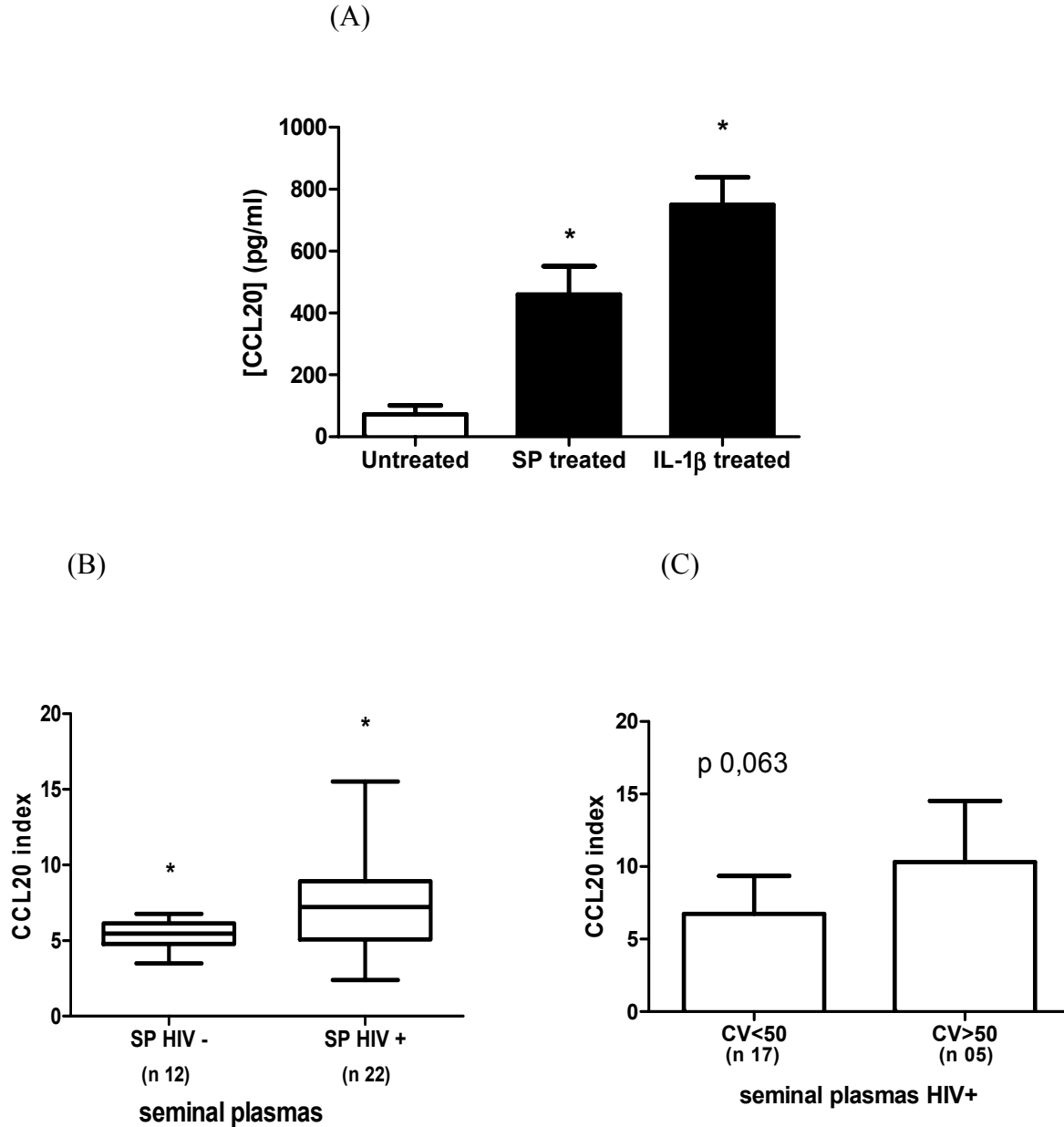


Figure 1: CCL20 production by vaginal epithelial cells monoestratified (HEC-1A) stimulated with culture medium DMEM-F12 (negative control), IL1B (25 ng / ml) (positive control) or seminal plasma (diluted 1:10). Supernatant HEC-1A cells were evaluated by ELISA. (A) Histogram representing four experiments with negative control (untreated cells) and positive (IL1B) and experiments using 12 different samples of HIV-negative participants. (B) CCL20 production induced by seminal plasma HIV- or HIV+. (C) CCL20 production by HEC-1A cells treated with seminal plasma HIV+ with detectable viral load > 50 copies / ml (n = 5) and with undetectable viral load < 50 copies / ml (n = 17).

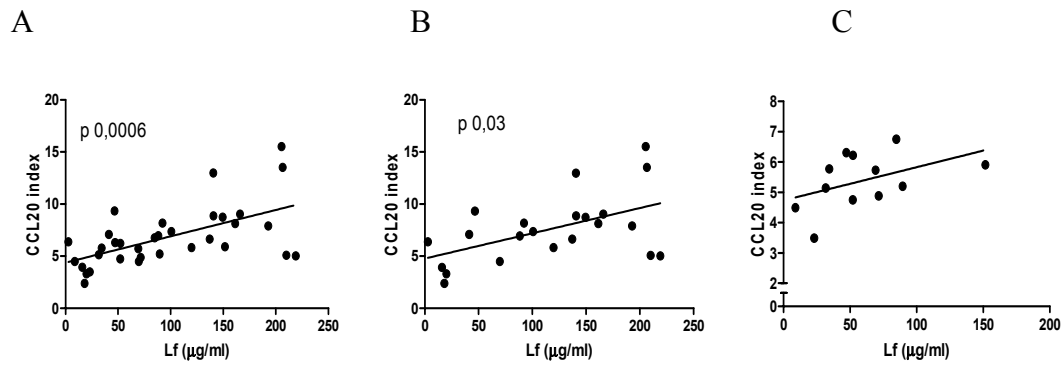


Figure 2: Correlation between Lf and CCL20 production by HEC-1A cells stimulated with seminal plasma. (A). Lf and CCL20 production of seminal plasma HIV + and HIV-. (B) Lf and CCL20 production stimulated with 22 seminal plasma HIV +. (C) Lf and production CCL20 by HEC 1A cells stimulated with 12 seminal plasma HIV- ($p = 0.08$).

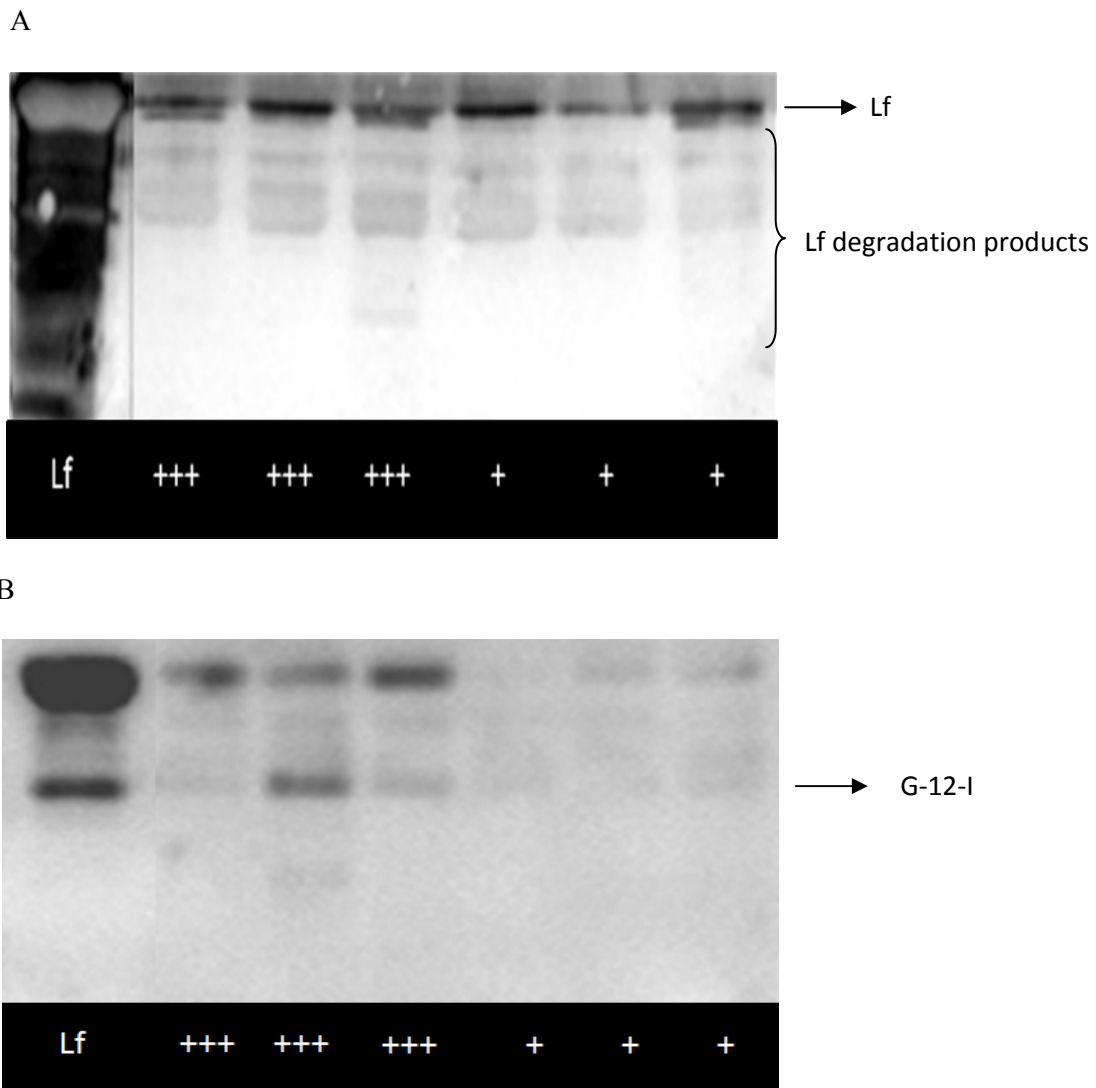


Figure 3: (A) Presence of Lf between the seminal plasma samples of HIV+ who most promoted the stimulation of CCL20 by HEC-1A cells (+++) and those less stimulated this production (+). (B) the presence of peptide G-12-I between the seminal plasma samples of HIV+ who more stimulated the production of CCL20 by HEC-1A cells (+++) and those less stimulated this production (+).

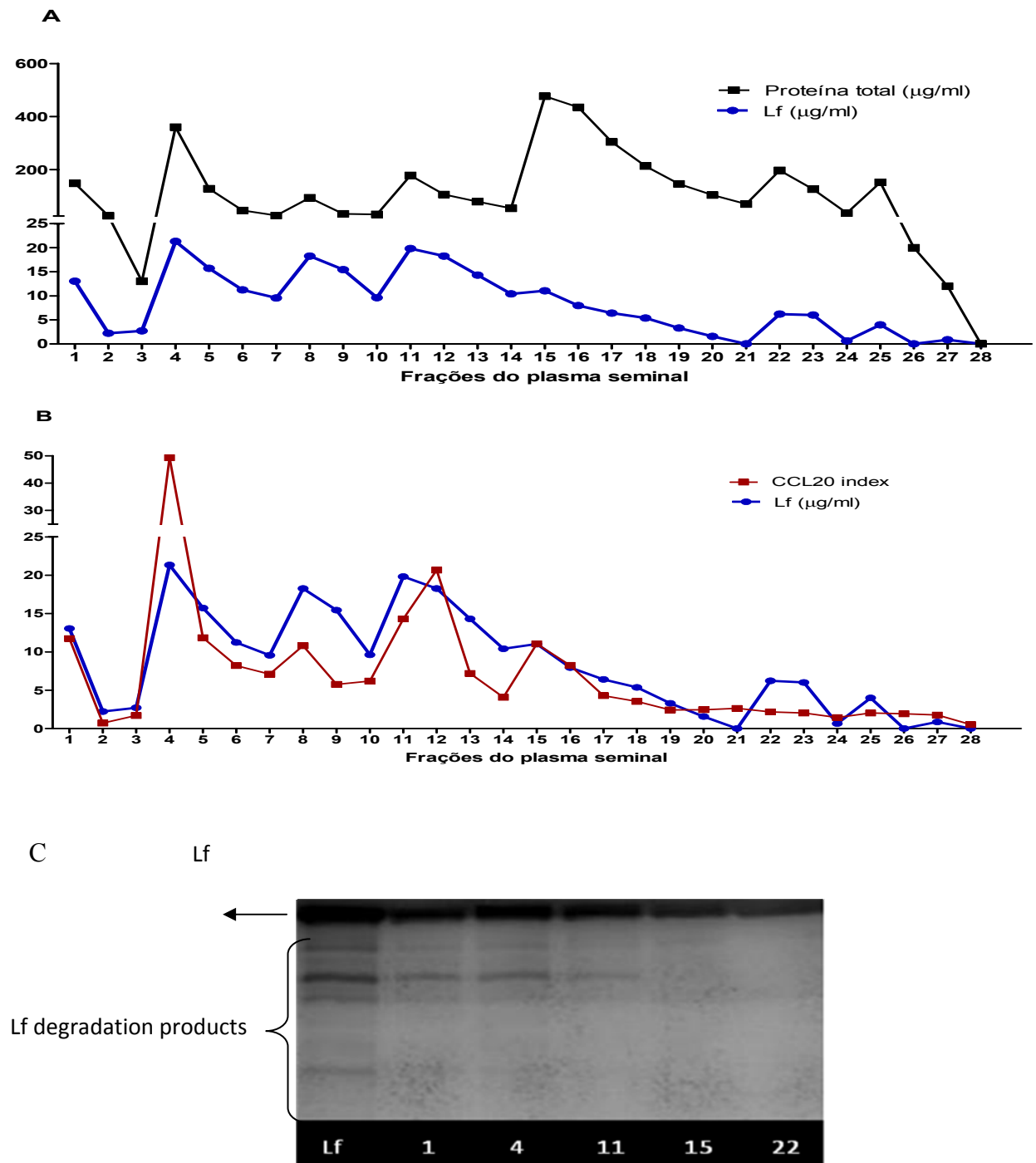


Figure 4. CCL20 production by the HEC-1A cells stimulated with fractions of seminal plasma. A pool of twelve HIV⁻ seminal plasmas was fractionated through Hitrap Q FF; GE Healthcare. (A) Total protein and Lf concentration in each fraction of seminal plasma. (B) Correlation between the production of CCL20 by HEC-1A cells and the concentration of Lf in each seminal plasma fraction. (C) Westerblot of different seminal plasma fractions (four experiments presented).

REFERENCES

ABIKO, Y.; NISHIMURA, M.; KUSANO, K.; NAKASHIMA, K.; OKUMURA, K.; ARAKAWA, T.; TAKUMA, T.; MIZOGUCHI, I.; KAKU, T. Expression of MIP-3alpha/CCL20, a macrophage inflammatory protein in oral squamous cell carcinoma. **Arch Oral Biol**, Oxford, v. 48, p. 171–175, 2003.

BERLIER, W.; CREMEL, M.; HAMZEH, H.; LÉVY, R.; LUCHT, F.; BOURLET, T.; POZZETTO, B.; DELÉZAY, O. Seminal plasma promotes the attraction of langerhans cells via the secretion of CCL20 by vaginal epithelial cells: involvement in the sexual transmission of HIV. **Hum Reprod**, Oxford, v. 21, p 1135-1142, 2006.

CHARBONNIER A.S.; KOHRGRUBER, N.; KRIEHLER, E.; STINGL, G.; ROT, A.; MAURER, D. Macrophage inflammatory protein 3alpha is involved in the constitutive trafficking of epidermal langerhans cells. **J Exp Med**, New York, v. 190, p. 1755–1768, 1999.

CHIRIBOGA, C.D.R. Mujer y SIDA conceptos sobre el tema. In: RICON B, VANDALE S, ALLEN B, LIGUORI AL. **Situacion de las mujeres y el VIH/SIDA en America Latina**. México: Instituto Nacional Salud Pública, 1997.

COHN, E.S.; CLARK, R.A. Sexually transmitted disease, HIV and AIDS in women. **Med Clin N Am**, Philadelphia, v. 87, p. 971-995, 2003.

CREMEL, M.; BERLIER, W.; HAMZEH, H.; COGNASSE, F.; LAWRENCE, P.; GENIN, C.; BERNENGO, J.C.; LAMBERT, C.; DIEU-NOSJEAN, M.C.; DELÉZAY, O. Characterization of CCL20 secretion by human epithelial vaginal cells: involvement in Langerhans cell precursor attraction. **J Leukoc Biol**, New York, v. 78, p. 158–166, 2005.

DENISON, F.C.; GRANT, V.E.; CALDER, A.A.; KELLY, R.W. Seminal plasma components stimulate interleukin-8 and interleukin-10 release. **Mol Hum Reprod**, Oxford, v. 5, p. 220–226, 1999.

DIEU-NOSJEAN, M.C.; MASSACRIER, C.; HOMEY, B.; VANBERVLIET, B.; PIN, J.J.; VICARI, A.; LEBECQUE, S.; DEZUTTER-DAMBUYANT, C.; SCHMITT, D.; ZLOTNIK, A. CAUX, C. Macrophage inflammatory protein 3alpha is expressed at inflamed epithelial surfaces and is the most potent chemokine known in attracting Langerhans cell precursors. **J Exp Med**, New York, v. 192, p. 705–718, 2000.

DONCEL, G.F.; JOSEPH, T.; THURMAN, A.R. Role of Semen in HIV-1 Transmission: Inhibitor or facilitator? **Am J Reprod Immunol**, New York, n. 65, p. 292–301, 2011.

GROOT, F. GEIJTENBEEK, T.B.H.; SANDERS, R.W.; BALWIN, C.E.; SANCHEZ-HERNANDEZ, M.; FLORIS, R.; VAN KOOYK, Y.; DE JONG, E.C.; BERKHOUT, B. Lactoferrin prevents dendritic cell-mediated human immunodeficiency virus type 1 transmission by blocking the DC-SIGN-gp120 interaction. **J Virol**, Washington, v. 79, p. 3009-15, 2005.

KAZMI, S.H.; NAGLIK, J.R.; SWEET, S.P.; EVANS, R.W.; O'SHEA, S.; BANATVALA, J.E.; CHALLACOMBE, S.J. Comparison of human immunodeficiency virus type 1-specific inhibitory activities in saliva and other human mucosal fluids. **Clin Vac Immunol**, v. 13, p. 1111-18, 2006.

KOMINE, K.; KOMINE, Y.; KUROISHI, T.; KOBAYASHI, J.; OBARA, Y.; KUMAGAI, K. Small molecule lactoferrin with an inflammatory effect but no apparent antibacterial activity in mastitic mammary gland secretion. **J Vet Med Sci**, Tokyo, v. 67, p. 667-677, 2005.

KOMINE, K.; KUROISHI, T.; OZAWA, A.; KOMINE, Y.; MINAMI, T.; SHIMAUCHI, H.; SUGAWARA, S. Cleaved inflammatory lactoferrin peptides in parotid saliva of periodontitis patients. **Mol Immunol**, Oxford, v. 44, p. 1498-508, 2007.

LI, Q.; ESTES, J.D.; SCHLIEVERT, P.M.; DUAN, L.; BROSNAN, A.J.; SOUTHERN, P.J.; REILLY, C.S.; PETERSON, M.L.; SCHULTZ-DARKEN, N.; BRUNNER, K.G.; NEPHEW, K.R.; PAMBUCCIAN, S.; LIFSON, J.D.; CARLIS, J.V.; HAASE, A.T. Glycerol monolaurate prevents mucosal SIV transmission. **Nature**, London, v. 23, n. 458, p. 1034-1038, 2009.

LIAO, F.; RABIN, R.L.; SMITH, C.S.; SHARMA, G.; NUTMAN, T.B.; FARBER, J.M. CC-chemokine receptor 6 is expressed on diverse memory subsets of T cells and determines responsiveness to macrophage inflammatory protein 3 alpha. **J Immunol**, Baltimore, v. 162, p. 186-194, 1999.

LORE, K.; LARSSON, M. The role of dendritic cells in the pathogenesis of HIV-1 infection. **APMIS**, Copenhagen, v. 111, p. 776-788, 2003.

NUNES, C.L.X.; GONÇALVES, L.A.; SILVA, P.T.; BINA, J.C. Clinical epidemiological characteristics of a group of HIV/AIDS infected women in Salvador-Bahia. **Rev Soc Brasil Med Trop**, Brasília, v. 37, n. 6, p. 436-440, 2004.

PIGUET, V.; BLAUVELT, A. Essential roles for dendritic cells in the pathogenesis and potential treatment of HIV disease. **J Invest Dermatol**, Baltimore, v. 119, p. 365-369, 2002.

ROBERTSON, S.A. Seminal plasma and male factor signalling in the female reproductive tract. **Cell Tissue Res**, Berlin, v.322, p. 43-52, 2005.

SCHUTYSER, E.; STRUYF, S.; VAN DAMME, J. The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. **Cytokine Growth Factor Rev**, Oxford, v. 14, p. 409-426, 2003.

SHARKEY, D.J.; MACPHERSON, A.M.; TREMELLEN, K.P.; ROBERTSON, S.A. Seminal plasma differentially regulates inflammatory cytokine gene expression in human cervical and vaginal epithelial cells. **Mol Hum Reprod**, Oxford, v. 13, p. 491–501, 2007.

SHEN, R.; RICHTER, H.E.; SMITH, P.D. Early HIV-1 Target Cells in Human Vaginal and Ectocervical Mucosa. **Am J Reprod Immunol**, New York, v. 65, p. 261-267, 2010.

UNAIDS / The Joint United Nations Programme on HIV/AIDS 2009. **AIDS epidemic update 09**, 2009. Disponível em: www.unaids.org. Acesso em 10/02/2010.

Saliva and sexual transmission of HIV

Keywords: saliva, HIV/AIDS, sexual transmission, CCL20, endocervical epithelial cells.

Authors: Alan Grupioni Lourenço¹, Alcyone Artioli Machado¹, Marilena Chinalli Komesu², Thomas Bourlet³, Bruno Pozzetto³, Olivier Delézay³

Institutions: ¹ Division of Infectious Diseases, Department of Internal Medicine, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto – Brazil; ² Department of Morphology, Stomatology and Physiology, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto – Brazil; ³ GIMAP, Groupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes, Faculté de Médecine J. Lisfranc, Saint Etienne, France

Corresponding author:

Olivier Delézay

To whom correspondence should be addressed at: GIMAP, Faculté de Médecine Jacques Lisfranc, 42023 Saint-Etienne cedex 02, France.

E-mail: delezay@univ-st-etienne.fr

ABSTRACT

Saliva must be considered as an important actor present in sexual intercourse and could interact with the female genital mucosa. However, there is no data concerning the influence of this factor on HIV sexual transmission. The aim of this study was to evaluate the role saliva in the secretion of CCL20 by monostratified endocervical epithelium cells culture (HEC-1A). CCL20 is a chemokine involved in immune cells recruitment and, in particular, in dendritic and Langerhans cells attraction. These cells are the primary targets for HIV infection, and can transport HIV particles through the genital epithelial structure to lymph nodes.

HEC-1A cells were incubated with 56 samples of saliva from HIV– or HIV+ subjects with different oral conditions (periodontally healthy and gingivitis/periodontitis) or recombinant human interleukin IL1- β (25 ng/ml, Peprotech), as positive control, or treated only with culture medium DMEM-F12, as negative control. The production of CCL20 in the supernatants of HEC-1A cells after 17 h (overnight) of treatment was quantified using ELISA. Mann Whitney test was used for data analysis.

Saliva were able to stimulate the production of CCL20 by epithelial cells, increasing 38,1 times the secretion of CCL20 compared to untreated cells (control). We did not found relationship between the production of CCL20 and oral conditions, neither with HIV status.

Saliva must be considered an important factor that could facilitate HIV entry through female genital mucosa. Its ability to significantly increase CCL20 secretion may be responsible of a enhanced recruitment of immune cells, first targets for HIV.

Keywords: saliva, HIV/AIDS, sexual transmission, CCL20, endocervical epithelial cells.

INTRODUCTION

Heterosexual transmission is the most common form of infection by human immunodeficiency virus (HIV) today. During male-to-female transmission, the virus is typically deposited in the vagina as cell-free or cell associated virions carried by semen (DONCEL; JOSEPH; THURMAN, 2011). In the absence of breaches in the vaginal mucosa, the mechanisms involved in the crossing of vaginal epithelium by HIV could involve the recruitment of immune cells that possess migratory properties, including macrophages, lymphocytes or Langerhans cells, which can be considered as the first target cells for this virus (LORE; LARSSON, 2003).

The Langerhans cells express proteins that can bind to the protein gp120 of HIV as the langerin (DE WITTE; NABATOV; GEIJTENBEEK, 2008). The regulation and recruitment of Langerhans cells is mediated by the chemokine CC motif ligand 20 (CCL20). The CCL20 is implicated in the formation and function of mucosal lymphoid tissue by chemoattraction of dendritic cells (among them Langerhans cells) and lymphocytes (BABA et al., 1997; DIEU-NOSJEAN et al., 2000).

This chemokine is expressed basally by mucosal epithelial cells, however, its expression can be stimulated by factors such as microbial lipopolysaccharide (LPS) and inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor (TNF- α) (SCHUTYSER et al., 2000). Saliva contains pro-inflammatory proteins, among them TNF- α and IL-1 β . Saliva composition may change depending on oral conditions, and this situation may be an important factor associated with saliva characteristics (SEXTON et al, 2001).

Studies have been made using seminal plasma (BERLIER et al, 2006), however, little is known about the involvement of saliva in CCL20 secretion.

Saliva can get in contact with the vaginal mucosa by oral sex, or using this secretion as a sexual lubricant. It is known that saliva is among the most widely used lubricants during sex (HASSAN et al., 2007, SMITH et al., 1998). In 2007, Hassan and colleagues conducting a study on female sex workers found the frequent use of saliva as a sexual lubricant. In this work, the authors reported a higher incidence of vaginal bacterial diseases in participants who used saliva as a lubricant during intercourse. Bacterial infections or even other types of infections in the vaginal mucosa can facilitate the penetration of HIV through the vaginal mucosa either by the increased fragility of infected epithelium, or the higher presence of immune cells, mainly leukocytes, which are target cells for HIV.

Analyzing the use of saliva as a lubricant during sex, dazzled the possibility of studying the ability of saliva to induce CCL20 production by monostratified endocervical epithelium cells culture (HEC-1A). This study warns about the risks of using saliva as a sexual lubricant, and the risks of passive oral sex. The increase CCL20 production by cells of the vaginal mucosa, which makes them more susceptible to HIV entry, because the recruitment of Langerhans cells in the vaginal mucosa (CREMEL et al, 2005), which could be infected with HIV present in male semen, or micro-bleeding in a heterosexual intercourse.

MATERIALS AND METHODS

Study Population

The study was performed at the Clinical Hospital of the School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil (CH-SMRP-USP) between april 2009 and December 2010. It was reviewed and approved by Ethics Committee of CH-SMRP-USP. The study and consent form were explained to all subjects by the investigator. A medical history and clinical examination were taken of subjects who signed the consent statement. The study population was 23 females and 34 males, with age 21 to 52 years and presented a minimum of 19 natural teeth and had received no periodontal treatment, or antibiotic therapy for medical or dental reasons 3 months prior to the investigation.

A total of 57 subjects was divided in four groups: 1. Group A: subjects without HIV infection (HIV-) and periodontally healthy (n = 11); 2. Group B: HIV- subjects and clinically diagnosed with gingivitis/periodontitis (n=12). Group C: subjects with HIV infection (HIV+) and periodontally healthy (n=11). 4. Group D: HIV+ subjects and clinically diagnosed with gingivitis/periodontitis (n=24).

Clinical Measures

All teeth except third molars were assessed for periodontal clinical measures. Clinical parameters, including probing depth (PD), clinical attachment level, and bleeding on probing (BOP), were measured at six sites per tooth.

Subjects from periodontally healthy exhibited < 3mm of attachment loss, no periodontal probing depth (PD) > 4mm, no signs of periodontal breakdown, and bleeding on probing (BOP) < 20%. The subjects from gingivitis exhibited < 3mm of attachment loss, PD < 4mm, no signs of periodontal breakdown, and BOP > 20%. Periodontitis subjects exhibited at least four sites with attachment loss > 3 mm, and at least four sites with PD>4 mm (RAMSEIER et al., 2009).

Saliva Sample Collection

Non-stimulated whole expectorated saliva was collected, approximately 5 ml, drooling into sterile plastic tubes according to the method described by Navazesh, in 1993. Subjects were refrained from eating, drinking, and oral hygiene for 1 hour prior to saliva collection. Saliva samples were placed on ice immediately and aliquoted. Saliva samples were centrifuged (800g, 30 min) and stored at -80°C until use. Saliva samples were sent to Groupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes, Faculté de Médecine J. Lisfranc, Saint Etienne, France for analysis.

Cell culture

HEC-1A cell line was routinely grown in Dulbecco's minimal essential medium DMEM-F12 medium (Cambrex BioScience, Verviers, Belgium) supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS) and antibiotic-antimycotic solution (penicillin-streptomycin-amphotericin B, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). For stimulation experiments, the cells were seeded onto 96-well culture plates (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA) at a density of 200 000 cells/well and cultured for 2 days before use.

Measurement of CCL20 secretion by HEC-1A cells

HEC-1A cells were incubated with saliva from HIV⁻ or HIV⁺ subjects with different oral conditions (Group A, B, C and D) (diluted 1:10 in culture medium) or recombinant human interleukin IL1- β (25 ng/ml, Peprotech), as positive control, or treated only with culture medium DMEM-F12, as negative control. The production of CCL20 in the supernatants of HEC-1A cells after 17 h (overnight) of treatment was quantified using ELISA detection kits (Quantikine, R&D systems, Abingdon, UK) according to the manufacturer's instructions. Optical densities were measured at 450 nm. Each assay was performed in duplicate.

The results are expressed as the relative CCL20 production compared to negative control (treated only with culture medium).

Statistical analysis

Graph Pad Prism 5 for Windows ® (InStat, USA) was used, and data was statistically analyzed with Mann-Whitney test.

RESULTS

Fifty-seven patients ranging in age from 21 to 52 years were evaluated for periodontal parameters, HIV infection and saliva's ability to stimulate the production of CCL20 by HEC-1A cells. Demographic data, clinical parameters are summarized in Table 1. The mean ages of the group A, B, C and D were similar. The ratio between men and woman, smokers also similar between the groups A, B, C and D. The average number of remaining teeth was approximately 26 teeth based on the entry criteria of a minimum of the 19 teeth. Patients with gingivitis/periodontitis (group B and D) showed higher prevalence of BOP and PD>4 than when compared to periodontally healthy subjects (Group A and C) ($p<0.001$).

Saliva promotes the induction of secretion of CCL20 by HEC-1A cells

The secretion of CCL20 was measured by ELISA in supernatants of HEC-1A cells incubated with only culture medium DMEM-F12 (negative control) or with IL-1 β (25ng/ml in DMEM-F12, positive control) or with saliva the 23 HIV- subjects (diluted 1:10 in DMEM-F12), after 17 hours of treatment. The supernatant of untreated HEC-1A cells (control group, 6 experiments total) showed a CCL20 concentration of $27,7 \pm 4,5$ pg / ml (observe the increased concentration on cells stimulated with IL-1 β and saliva samples). IL1 β -treated cells showed a concentration of 1169 ± 129 pg / ml of CCL20 (positive control) ($p < 0.001$), and HEC-1A cells stimulated with 23 saliva samples from HIV- subjects showed an average CCL20 concentration of 1015 ± 378 pg / ml ($p<0.001$) (Figure 1-A).

Saliva promotes the induction of CCL20 secretion by HEC-1A cells independently of HIV seropositivity of the participants.

We conducted a study of stimulation of HEC-1A cells with 23 saliva samples of HIV- participants and 34 saliva samples from HIV+ participants. The saliva of HIV- participants stimulated $36,1 \pm 12,2$ times the concentration of CCL20 in relation to its control group

(untreated cells), while the saliva of HIV+ participants stimulated $39,5 \pm 14,4$ times the CCL20 production in relation to its control group. It was possible to observe a greater stimulation of the production of CCL20 from the salivary plasma samples from participants' HIV+ and HIV -, however no statistical differences between them could be measured ($p=0.9287$) (Figure 1-B).

Saliva promotes the induction of CCL20 secretion by HEC-1A cells independently oral conditions of the participants.

Among the groups in HIV- and HIV+, we check if local factors represented by the oral condition, participants were determinant in the production of CCL20 by HEC-1A cells stimulated with saliva. For this purpose we divided the participants into groups A, B, C and D as described in Materials and Methods.

Between the HIV- participants not verify differences between periodontal status and stimulation of CCL20 production by HEC-1A cells (group A and B) ($p = 0.7399$). The saliva from group A stimulated the secretion of CCL20 in 34.58 ± 13.67 times compared to control (untreated cells), whereas the one from group B stimulated the secretion of CCL20 in 37.57 ± 11.15 times compared to the group control (untreated cells) ($p = 0.7399$).

Results were similar between the HIV+ participants ($p = 0.4615$): Saliva from group C ($n = 11$) stimulated the secretion of CCL20 in 42.39 ± 15.54 times, and saliva from group D in $38,07 \pm 14.01$ times compared to control (untreated cells) (Figure 2).

DISCUSSION

Langerhans cells present in the vaginal mucosa are known as "Trojan horse" for facilitating the passage of HIV through the vaginal mucosa and present them to Lymphocyte T CD4⁺. (PIGUET, BLAUVELT, 2002). The CCL20 is a potent chemokine for Langerhans cells recruitment and its production by epithelial cells is related to an increased risk of HIV infection (CREMEL et al., 2005, BERLIER et al., 2006).

Kaser and cols. (2004) found that cell cultures from colon increased the secretion of CCL20 when stimulated with the proinflammatory cytokine TNF- α . Cremel and cols. (2005) demonstrated that vaginal epithelial cells increased their secretion of CCL20 in response to stimulation by proinflammatory cytokine IL-1 β . Saliva contains pro-inflammatory proteins, among them TNF- α and IL-1 β . These cytokines are in higher concentrations in patients with some degree of periodontal inflammation (SEXTON et al., 2011). As the presence of these cytokines is abundant in saliva, we hypothesized that the cytokines present in saliva could stimulate the production of CCL20 by HEC-1A. In order to verify this hypothesis we divided the participants into seropositive and seronegative for HIV, and subdivided these groups into subgroups according to their periodontal condition, and stimulate cell cultures HEC-1A with the saliva of all participants.

Although no difference between the production of CCL20 by HEC-1A cells stimulated with saliva of HIV- and HIV+ participants in different oral conditions (group A, B, C and D), all saliva samples were responsible for a significant increase in the production of CCL20 by HEC-1A cells. As there was no relationship between oral conditions of the participants and stimulating the production of CCL20 cells HEC-1A, we hypothesized that the concentrations of proinflammatory cytokines in periodontally healthy participants was sufficient to increase the production of CCL20 by HEC-1A cells, or saliva can introduce another factor responsible for increase in the secretion of CCL20 cells HEC-1A.

As the CCL20 is a cytokine responsible for chemoattraction of dendritic cells, among them Langerhans cells, their stimulation can increase the concentration of target cells for HIV, which would facilitate the infection by HIV.

Not only HIV present in saliva would facilitated its entrance, but also the saliva, use as lubricant, could prepare a more prone environment for entry of HIV present in blood or semen infection in a posterior heterosexual intercourse.

Sexual freedom promoted in the 60s, 70 and 80 increased the oral sex practice (EDWARDS, MEAT, 1998). The study of HIV transmission through oral sex is difficult to execute, because in most cases, the HIV-infected patients were in contact with other forms of sexual relations, not exclusively oral sex.

De Vincenzi, in 1994, conducted a longitudinal study for two years, with 50 heterosexual couples with discordant HIV serology, who practiced vaginal and anal sex with condom use, however, assumed that practiced oral sex in an unprotected form. Over the course the two years of study, none seroconversion was reported. Similar work was conducted in 2002 by Del Romero and cols. who conducted a longitudinal study for ten years, observing 263 couples discordant for the HIV serology, who practiced vaginal and anal sex with condom use, and practiced oral sex without any protection. In this study, also there was any seroconversion. In these two studies, oral sex does not present risks in relation to HIV infection, However we have shown that the saliva in contact with the female genital mucosa can promote production of CCL20 and could be responsible for chemotaxis of Langerhans cells, increasing therefore the risks of HIV transmission, which probably is prevented by safe sexual intercourse by using condoms.

Other studies describe additional risks to the use of saliva as a sexual lubricant. Thomas and cols. in 2004 reported that the presence of hydrogen peroxide in the vaginal mucosa produced by microorganisms of the family of lactobacilli, which are commonly found in the oral cavity, are responsible for an imbalance of normal flora of the vaginal mucosa. The alteration of the normal flora can increase the risk of bacterial vaginosis and development recurrent infections in the urinary tract by *Escherichia coli*, thereby increasing the risk of HIV infection.

Campo and cols. in 2006, reported that active oral sex provides a higher risk of transmission of HIV than passive oral sex, due to possible presence of aphthae, erosions, ulcers and inflammation in the oral cavity. In contrast, our study showed that the risks of passive oral sex may be greater than previously believed, already that this may make the vaginal mucosa more permissive to the entrance of HIV present in semen or blood, by increasing concentrations of Langerhans cells and increasing concentrations of CCL20 secreted by vaginal epithelial cells. We conclude that saliva may stimulate the production of CCL20 by monostratified endocervical epithelium, alerting for the risks of passive oral sex and the use of saliva as a sexual lubricant.

Table 1. Patient demographics and clinical parameters stratified by level of disease.

	Group A HIV- healthy	Group B HIV- Gingivitis/Periodontitis	Group C HIV+ healthy	Grupo D HIV+ Gingivitis/periodontitis	p value Comparing A versus B	p value Comparing C versus D
Subjects (n)	11	12	11	23		
Males (%)	45	58	55	70	0,54	0,39
Females (%)	55	42	45	30	0,54	0,39
Smokers (%)	9	25	9	25	0,31	0,27
Mean number of teeth	26	27	27	25	0,48	0,18
Mean age (years)	36	34	35	39	0,97	0,07
Sites with BOP (%)	10	36	8	30	>0,001	>0,001
gingivitis (n)	NA	8	NA	17		
Periodontitis		4		7		
Sites with PD>4 (%)	NA	7	NA	5		

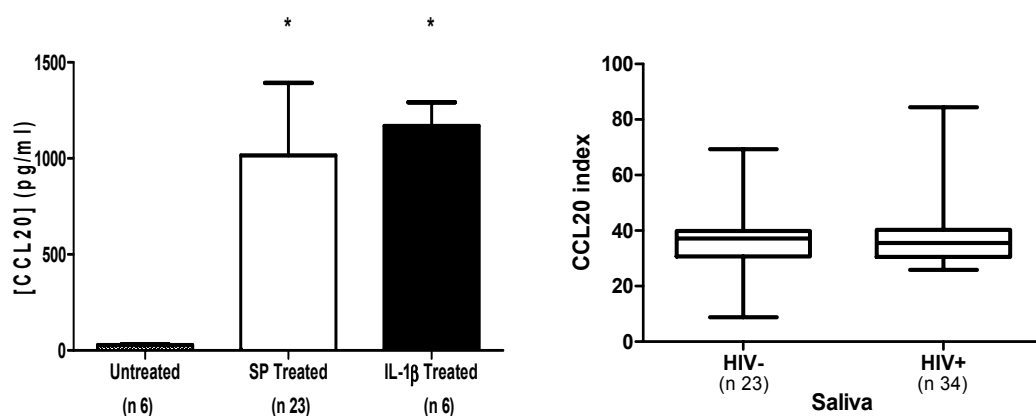


Figure 1: CCL20 production by genital epithelial cells (HEC-1A) stimulated with culture medium DMEM-F12 (negative control), IL1 β (25 ng / ml) (positive control) or saliva (diluted 1:10). (A) Histogram representing six experiments with negative control (untreated cells), six experiments with positive control (IL1 β) and experiments using 23 different saliva samples from HIV- participants. * Statistical significance compared to group control ($p < 0.001$) (B) CCL20 production induced by saliva from HIV- participants ($n = 23$) and HIV+ participants ($n = 34$) ($p = 0.9287$).

CCL20 index: Stimulation of CCL20 related to non-treated HEC-1A cells (control group).

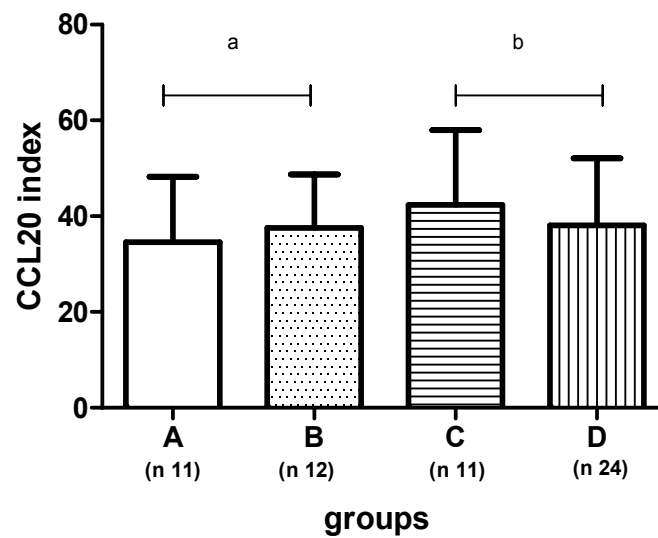


Figure 2. CCL20 production by HEC-1A cells treated with saliva from HIV- and HIV+ participants. A: subjects without HIV infection (HIV-) and periodontally healthy (n = 11). B: subjects HIV- and clinically diagnosed with gingivitis/periodontitis (n=12). C: subjects with HIV infection (HIV+) and periodontally healthy (n=11). D: subjects with HIV infection and clinically diagnosed with gingivitis/periodontitis (n=24). a: Mann Whitney test (p= 0,7399) b: Mann Whitney test (p=0,4615).

CCL20 index: Stimulation of CCL20 related to non-treated HEC-1A cells (control group).

REFERENCES

- BABA, M.; IMAI, T.; NISHIMURA, M.; KAKIZAKI, M.; TAKAGI, S.; HIESHIMA, K.; NOMIYAMA, H.; YOSHIE, O. Identification of CCR6, the specific receptor for a novel lymphocyte-directed CC chemokine LARC. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 272, n. 23, p. 14893–14898, 1997.
- BERLIER, W.; CREMEL, M.; HAMZEH, H.; LÉVY, R.; LUCHT, F.; BOURLET, T.; POZZETTO, B.; DELÉZAY, O. Seminal plasma promotes the attraction of langerhans cells via the secretion of CCL20 by vaginal epithelial cells: involvement in the sexual transmission of HIV. **Hum Reprod**, Oxford, v. 21, p. 1135-1142, 2006.
- CAMPO, J.; PEREA, M.A.; DEL ROMERO, J.; CANO, J.; HERNANDO, V.; BASCONES, A. Oral transmission of HIV, reality or fiction? An update. **Oral Dis**, Copenhagen, v. 12, p. 219–228, 2006.
- CREMEL, M.; BERLIER, W.; HAMZEH, H.; COGNASSE, F.; LAWRENCE, P.; GENIN, C.; BERNENGO, J.C.; LAMBERT, C.; DIEU-NOSJEAN, M.C.; DELÉZAY, O. Characterization of CCL20 secretion by human epithelial vaginal cells: involvement in Langerhans cell precursor attraction. **J Leukoc Biol**, New York, v. 78, p. 158–166, 2005.
- DE VINCENZI, I. A longitudinal study of human immunodeficiency virus transmission by heterosexual partners. **N Engl J Med**, Boston, v. 331, p. 341–346, 1994.
- DE WITTE, L.; NABATOV, A.; GEIJTENBEEK, T.B. Distinct roles for DC-SIGN+-dendritic cells and Langerhans cells in HIV-1 transmission. **Trends Mol Med**, Oxford, v. 14, p. 12-19, 2007.
- DEL ROMERO, J.; MARINCOVICH, B.; CASTILLA, J.; GARCÍA, S.; CAMPO, J.; HERNANDO, V.; RODRÍGUEZ, C. Evaluating the risk of HIV transmission through unprotected orogenital sex. **AIDS**, London, v. 16, p. 1296–1297, 2002.
- DIEU-NOSJEAN, M.C.; MASSACRIER, C.; HOMEY, B.; VANBERVLIET, B.; PIN, J.J.; VICARI, A.; LEBECQUE, S.; DEZUTTER-DAMBUYANT, C.; SCHMITT, D.; ZLOTNIK, A. CAUX, C. Macrophage inflammatory protein 3 α is expressed at inflamed epithelial surfaces and is the most potent chemokine known in attracting Langerhans cell precursors. **J Exp Med**, New York, v. 192, p. 705–718, 2000.
- DONCEL, G.F.; JOSEPH, T.; THURMAN, A.R. Role of Semen in HIV-1 Transmission: Inhibitor or facilitator? **Am J Reprod Immunol**, New York, n. 65, p. 292–301, 2011.

EDWARDS, S.; CARNE, C. Oral sex and the transmission of viral STIs. **Sex Transm Inf**, London, v. 74, p. 6–10, 1998.

HASSAN, W.M.; LAVREYS, L.; CHOCHAN, V.; RICHARDSON, B.A.; MANDALIYA, K.; NDINYA-ACHOLA, J.O.; KIARIE, J.; JAOKO, W.; HOLMES, K.K.; MCCLELLAND, R.S. Associations between intravaginal practices and bacterial vaginosis in Kenyan female sex workers without symptoms of vaginal infections. **Sex Transm Dis**, Philadelphia, v. 34, n. 6, p. 384–8, Jun 2007.

KASER, A.; LUDWICZEK, O.; HOLZMANN, S.; MOSCHEN, A.R.; WEISS, G.; ENRICH, B.; GRAZIADEI, I.; DUNZENDORFER, S.; WIEDERMANN, C.J.; MÜRZL, E.; GRASL, E.; JASAREVIC, Z.; ROMANI, N.; OFFNER, F.A.; TILG, H. Increased expression of CCL20 in human inflammatory bowel disease. **J Clin Immunol**, New York, v. 24, p. 74–85, 2004.

LORE, K.; LARSSON, M. The role of dendritic cells in the pathogenesis of HIV-1 infection. **APMIS**, Copenhagen, v. 111, p. 776–788. 2003

NAVAZESH, M. Methods for collecting saliva. **Ann N Y Acad Sci**, New York, v. 694, v. 72–77, 1993.

PIGUET, V.; BLAUVELT, A. Essential roles for dendritic cells in the pathogenesis and potential treatment of HIV disease. **J Invest Dermatol**, Baltimore, v. 119, p. 365–369, 2002.

RAMSEIER, C.A.; KINNEY, J.S.; HERR, A.E.; BRAUN, T.; SUGAI, J.V.; SHELBURNE, S.A. RAYBURN, L.A. TRAN, H.M.; SINGH, A.K. GIANNOBILE, W.V. Identification of Pathogen and Host-Response Markers Correlated With Periodontal Disease. **J Periodontol**, Chicago, v. 80, p. 436–446, 2009.

SCHUTYSER, E.; STRUYF, S.; MENTEN, P.; LENAERTS, J.P.; CONINGS, R.; PUT, W.; WUYTS, A.; PROOST, P.; VAN DAMME, J. "Regulated production and molecular diversity of human liver and activation-regulated chemokine/macrophage inflammatory protein-3 alpha from normal and transformed cells". **J. Immunol**, Baltimore, v. 165, n. 8, p. 4470–7, 2000.

SEXTON, W.M.; LIN, Y.; KRYSCIO, R.J.; DAWSON, D.R.; EBERSOLE, J.L.; MILLER, C.S. Salivary biomarkers of periodontal disease in response to treatment. **J Clin Periodontol**, Copenhagen, v. 38, p. 434–41, 2011.

SMITH, A.M.; JOLLEY, D.; HOCKING, J.; BENTON, K.; GEROFI, J. Does additional lubrication affect condom slippage and breakage? **Int J STD AIDS**, London, v. 9, n. 6, p. 330-5, 1998.

TOMÁS, M.S.; CLAUDIA, O.M.; OCANA, V.; NADER-MACIAS, M. Production of antimicrobial substances by lactic acid bacteria. I: determination of hydrogen peroxide. **Methods Mol Biol**, Clifton, v. 268, p. 337–346, 2004.